

Letícia Silva Mesquita

Perfil genético de suscetibilidade imunológica para infeção por EBV  
em doentes submetidos a transplante de células progenitoras  
hematopoiéticas

Dissertação de Candidatura ao grau de  
Mestre em Oncologia submetida ao Instituto  
de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da  
Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Hugo Sousa  
Categoria – Doutorado em Ciências  
Biomédicas

Afiliação – Instituto Português de Oncologia  
do Porto

Co-orientador – Mestre Joana Dias  
Categoria – Mestre em Microbiologia  
Aplicada

Afiliação – Instituto Português de Oncologia  
do Porto



Aos meus pais, pelo esforço e pela dedicação

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Professor Doutor Hugo Sousa, por toda a ajuda, disponibilidade e compreensão que me deu ao longo desta fase tão importante da minha vida. É com gratidão que reconheço a confiança que me deu e o sentido de responsabilidade que desenvolvi ao longo deste projeto. Agradeço, também, a oportunidade de me poder integrar no grupo de investigação “Oncologia Molecular” e, desta forma, poder aprender mais e apurar o gosto pela descoberta, pela investigação.

Ao Serviço de Hematologia do IPO do Porto, especialmente ao Dr. Carlos Mendes e à Doutora Isabel Barbosa por permitirem o acesso às amostras, essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Serviço de Transplante de Medula Óssea do IPO do Porto, nomeadamente ao Dr. António Campos Júnior, a todos os clínicos e a todas as pessoas do secretariado por permitirem o acesso aos dados clínico-patológicos.

Ao Serviço de Virologia, nomeadamente à Dra. Inês Baldaque e a todos os colaboradores pelo acesso aos resultados de diagnóstico laboratorial.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros pela disponibilidade e pela simpatia.

À Joana Ribeiro pela ajuda, pela disponibilidade e pela boa disposição que me foram proporcionadas ao longo desta caminhada.

Aos meus colegas de laboratório, Andreia Oliveira, Isabel Paiva, Joana Silva, Liliana Raeiro, Marco Neves e Marlene Esteves por toda a ajuda. Agradeço, especialmente, à Andreia Oliveira e à Marlene Esteves pelos bons momentos, pelo apoio, pela boa disposição e por estarem comigo sempre que precisei.

À minha amiga, Joana Galante, pelo apoio e pela ajuda que me deu. Obrigada por estares sempre comigo.

Ao meu namorado, Nelson, pelo apoio e pela paciência que teve comigo ao longo desta fase da minha vida. Obrigada pelos bons momentos e por me animares e encorajares quando mais precisei.

À minha prima Débora, pois é como uma irmã para mim e foi um apoio fundamental. Obrigada por tudo!

Aos meus pais, pois sem eles nada disto teria sido possível. Obrigada pelo apoio, pelo esforço e pela dedicação necessários para poder realizar esta etapa da minha vida. Agradeço, também, aos meus irmãos, Sara e Samuel, pois são sem dúvida muito importantes para mim.

## ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1. Vírus Epstein-Barr (EBV)</b>	2
1.1. Características gerais	2
1.2. Epidemiologia	2
1.3. Ciclo de infeção do EBV	3
1.3.1. Infeção primária	3
1.3.2. Latência	4
1.4. Patologias associadas	4
<b>2. O EBV e o desenvolvimento de PTLD</b>	6
2.1. EBV e transplantação de células progenitoras hematopoiéticas	6
2.2. Doença Linfoproliferativa Pós-Transplante (PTLD)	7
2.3. Mecanismo de evasão do EBV e desenvolvimento de PTLD	7
<b>3. Suscetibilidade imunológica para infeção</b>	9
3.1. Citocinas reguladoras da resposta imunológica	9
3.2. Resposta imunológica às infeções virais	10
3.2.1. Resposta imune inata	10
3.2.2. Resposta imune adaptativa	11
<b>4. Suscetibilidade genética para infeções virais</b>	12
4.1. Polimorfismo CR2 +24T>C (rs3813946)	12
4.2. Polimorfismos HLA-A (rs2530388)	13
4.3. Polimorfismo HcG9 (rs6457110)	13
4.4. Polimorfismo IFNG-R1 -56C>T (rs2234711)	13
4.5. Polimorfismos IL-1 $\alpha$ +4854G>T (rs17561)	14
4.6. Polimorfismo IL-1 $\beta$ +3954C>T (rs1143634)	14
4.7. Polimorfismos IL-1RN	14
4.8. Polimorfismos IL-2 -330 T>G (rs2069762)	15
4.9. Polimorfismo TNF- $\alpha$ -308G>A (rs1800629)	15
<b>OBJETIVOS</b>	17
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	19
1. Tipo de estudo e população	20
2. Colheita e processamento de amostras	21
3. Genotipagem	21
3.1. Protocolos <i>Alele Specific Real-Time</i> PCR (AS RT-PCR)	22
3.2. Protocolo IL-1RN VNTR	23
4. Controlo de qualidade	24
5. Questões éticas	24
6. Análise estatística	24

<b>RESULTADOS</b>	25
1. <b>Caracterização da população do estudo</b>	26
1.1. Caracterização dos doentes submetidos a aHSCT	26
1.2. Caracterização dos dadores de células progenitoras hematopoiéticas	28
1.3. Caracterização dos transplantes	29
2. <b>Caracterização da infeção por EBV</b>	30
3. <b>Caracterização dos polimorfismos genéticos</b>	33
4. <b>Associação dos genótipos com a infeção por EBV</b>	35
<b>DISCUSSÃO</b>	38
1. <b>Infeção por EBV em doentes submetidos a aHSCT</b>	39
2. <b>Suscetibilidade genética</b>	41
2.1. Polimorfismo CR2 +24T>C (rs3813946)	41
2.2. Polimorfismo HLA-A (rs2530388)	41
2.3. Polimorfismo HcG9 (rs6457110)	42
2.4. Polimorfismo IFNG-R1 -56C>T (rs2234711)	43
2.5. Polimorfismo IL-1 $\alpha$ +4854G>T (rs17561)	43
2.6. Polimorfismo IL-1 $\beta$ +3954C>T (rs1143634)	44
2.7. Polimorfismos IL-1RN	44
2.7.1. Polimorfismo IL-1RN +2018T>C (rs419598)	45
2.7.2. Polimorfismo IL-1RN VNTR	45
2.8. Polimorfismo IL-2 -330 T>G (rs2069762)	45
2.9. Polimorfismo TNF- $\alpha$ -308G>A (rs1800629)	46
<b>CONCLUSÃO</b>	47
<b>PERSPETIVAS FUTURAS</b>	49
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura do EBV .....	2
<b>Figura 2:</b> Patogénese do EBV .....	4
<b>Figura 3:</b> Proteínas expressas nos diferentes tipos de latência e patologias .....	5
<b>Figura 4:</b> Padrão de infeções desencadeadas após HSCT .....	6
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de evasão do EBV e desenvolvimento de PTLD .....	8
<b>Figura 6:</b> Imagem representativa da discriminação alélica para o polimorfismo IL-2 -330T>G (rs2069762) .....	22
<b>Figura 7:</b> Imagem representativa da deteção dos diferentes genótipos para o polimorfismo IL-2 -330T>G (rs2069762) por PCR em tempo real, com demonstração das curvas de amplificação das amostras .....	23
<b>Figura 8:</b> Imagem representativa de alguns dos diferentes genótipos possíveis para o polimorfismo IL-1RN VNTR .....	23
<b>Figura 9:</b> Gráfico representativo da distribuição das idades dos doentes .....	26
<b>Figura 10:</b> Gráfico representativo da distribuição das idades dos dadores .....	28
<b>Figura 11:</b> Gráficos representativos da distribuição do tempo até infeção EBV .....	30
<b>Figura 12:</b> Gráficos representativos da distribuição da carga viral de EBV em escala logarítmica .....	30

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Caracterização de PTLD segundo a OMS .....	7
<b>Tabela 2:</b> Polimorfismos genéticos e diferentes técnicas de análise .....	21
<b>Tabela 3:</b> Polimorfismos genéticos estudados por AS RT-PCR .....	22
<b>Tabela 4:</b> Caracterização dos doentes submetidos a aHSCT .....	27
<b>Tabela 5:</b> Caracterização dos dadores de células progenitoras hematopoiéticas .....	28
<b>Tabela 6:</b> Caracterização da informação relativa ao transplante .....	29
<b>Tabela 7:</b> Caracterização da infeção por EBV segundo as diferentes variáveis .....	31
<b>Tabela 8:</b> Genótipo dos recetores e dos dadores para os diferentes polimorfismos .....	33
<b>Tabela 9:</b> Caracterização dos genótipos em função da presença de infeção por EBV .....	36
<b>Tabela 10:</b> Análise de risco para o desenvolvimento de infeção por EBV segundo o genótipo de cada doente.....	37



## LISTA DE ABREVIATURAS

**aHSCT:** Transplante alogénico de células progenitoras hematopoiéticas

**AS RT-PCR:** *Alele Specific Real-Time PCR*

**APC:** Células apresentadoras de antígenos

**ATG:** *Antithymocytic Globulin*

**bp:** Pares de bases

**CD3:** *Cluster of Differentiation 3*

**CMV:** Citomegalovírus

**CR2/CD21:** Recetor do complemento 2

**CsA:** Ciclosporina

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dNTPs:** *Deoxynucleotide Triphosphates*

**EBER:** Pequeno RNA nuclear

**EBNA:** Antígeno nuclear do EBV

**EBV:** *Vírus Epstein-Barr*

**GVHD:** Doença de enxerto contra hospedeiro

**HLA:** Antígeno de histocompatibilidade leucocitária

**HcG9:** *HLA complex Group 9*

**HSCT:** Transplante de células progenitoras hematopoiéticas

**IC95%:** Intervalo de confiança a 95%

**IFN- $\alpha$ :** Interferão alfa

**IFN- $\beta$ :** Interferão beta

**IFN- $\gamma$ :** Interferão gama

**IFNG-R1:** Interferão gama recetor 1

**IL-1 $\alpha$ :** Interleucina 1 alfa

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta

**IL-1RN:** Recetor antagonista da interleucina 1

**IL-2:** Interleucina 2

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-12:** Interleucina 12

**IM:** Mononucleose infecciosa

**IPO:** Instituto Português de Oncologia

**LMP1:** Proteína de membrana de latência 1

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de magnésio

**MHC:** Major de histocompatibilidade

**MMF:** Micofenolato mofetil

**MTX:** Metotrexato

**NF-κB:** Fator nuclear kappa B

**NA:** Ácidos nucleicos

**NK:** *Natural Killer*

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**OR:** *Odds Ratio*

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**pDCs:** Células dendríticas plasmocitóides

**PRR:** *Pattern Recognition Receptors*

**PTLD:** Doença linfoproliferativa pós-transplante

**RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RIC:** Condicionamento de intensidade reduzida

**RNA:** Ácido ribonucleico

**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism*

**STMO:** Serviço de Transplante de Medula Óssea

**TCD4/ Th:** T auxiliares

**TCD8/ CTL:** Linfócitos T citotóxicos

**TCR:** Recetor da célula T

**Th1:** T auxiliar 1

**TLR:** *Toll-like Receptor*

**TNF-α:** Fator de necrose tumoral alfa

**Treg:** T reguladoras

**VNTR:** Número variável de repetições em série



## RESUMO/ SUMMARY

## RESUMO

O vírus de *Epstein-Barr* (EBV) é considerado o agente etiológico de várias patologias, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos. Nos doentes submetidos a transplante alogénico de células progenitoras hematopoiéticas (aHSCT), as infeções virais são consideradas como a principal causa de morbilidade e mortalidade. Nestes doentes, o EBV tem sido amplamente associado ao desenvolvimento de doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), que contribui para a morbilidade/mortalidade destes doentes. No entanto, nem todos os doentes são suscetíveis ao desenvolvimento de infeção por EBV e, consequentemente, de PTLD. São vários os estudos que demonstram a importância de estudar o perfil genético dos doentes para avaliar a sua suscetibilidade para o desenvolvimento destas infeções. A predisposição genética do hospedeiro para infeção por EBV pode envolver múltiplos genes e estudos recentes têm demonstrado a importância dos polimorfismos em citocinas na definição do risco. Desta forma, a análise de polimorfismos e o estudo de perfis genéticos são importantes, pois permitem identificar os indivíduos em risco de desenvolvimento de infeção e suas consequências.

O principal objetivo deste estudo era definir um perfil genético de suscetibilidade imunológica para infeção por EBV em doentes submetidos a aHSCT. Para tal, foi estudada uma população de 77 doentes (32 do género feminino e 45 do género masculino) diagnosticados com diferentes patologias hematológicas e submetidos a aHSCT no Instituto Português de Oncologia do Porto. Foi efetuada a deteção de EBV pela técnica de PCR em tempo real quantitativo. Os polimorfismos analisados neste estudo foram os seguintes: CR2 +24T>C, HLA-A A>T, HcG9 A>T, IFNG-R1 -56C>T, IL-1 $\alpha$  +4854G>T, IL-1 $\beta$  +3954C>T, IL-1RN +2018T>C, IL-1RN VNTR, IL-2 -330T>G e TNF- $\alpha$  -308G>A.

A pesquisa de EBV foi realizada em 38 dos 77 doentes. Destes 38 doentes, 15 apresentaram infeção por EBV (39,5%). A mediana do tempo até à infeção foi de 56 dias após o transplante e a carga viral média à data de diagnóstico foi de 3,47 log células/mL sangue.

A comparação da distribuição genotípica dos polimorfismos nos dadores e nos recetores, revelou que não existem diferenças na sua distribuição ( $p>0,050$ ), à exceção do IL-1RN VNTR ( $p<0,001$ ).

Quando comparada a distribuição genotípica em função da infeção por EBV, observou-se uma ligeira diferença na distribuição dos seguintes polimorfismos: HLA-A A>T, HcG9 A>T, IL-1 $\alpha$  +4854G>T, IL-1 $\beta$  +3954C>T e IL-2 -330T>G. Apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, observou-se a existência de um

aumento no risco para infeção por EBV, o que revela a necessidade de estudar melhor estes polimorfismos. No que diz respeito ao polimorfismo do IFNG-R1 -56C>T, apesar dos resultados serem *borderline* ( $p=0,051$ ; OR=5,00; IC95% 0,91-27,5), observou-se que os indivíduos portadores do alelo C apresentam um risco aumentado em cinco vezes para desenvolver infeção por EBV.

Este foi o primeiro estudo realizado numa população portuguesa que abordou o desenvolvimento de infeção por EBV em doentes transplantados e analisou o papel de polimorfismos genéticos em genes de resposta inflamatória e antiviral na suscetibilidade para o desenvolvimento de infeção. Os dados revelam a necessidade de mais estudos para confirmar e clarificar a existência de um perfil genético de suscetibilidade para infeção por EBV em doentes submetidos a aHSCT.

## SUMMARY

*Epstein-Barr virus* (EBV) is considered to be the ethiological agent of several pathologies, mainly, in immunocompromised individuals. In patients who have undergone allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT), viral infections are considered to be the main cause of morbidity and mortality. In these patients, EBV has been widely associated with the development of post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), which contributes to the morbidity/mortality of these patients. However, not all patients are susceptible to the development of EBV infection and consequently, to PTLD. There are several studies that demonstrate the importance of studying the patients' genetic profile, in order to evaluate their susceptibility to develop these infections. The host's genetic predisposition to EBV infection may involve multiple genes, and recent studies have demonstrated the importance of polymorphisms in cytokines, when defining the risk. Thus, the analysis of polymorphisms and study of genetic profiles are important since they allow identification of individuals who are at risk of developing the infection and its consequences.

The main objective of this study was to define a genetic profile of immunological susceptibility to EBV infection, in patients who have undergone aHSCT. In order to do so, a population of 77 patients (32 females and 45 males) diagnosed with hematopathologies and subjected to aHSCT at Instituto Português de Oncologia do Porto was studied. A detection of EBV was performed using real-time quantitative PCR and the following polymorphisms were analysed: CR2 +24T>C, HLA-A A>T, HcG9 A>T, IFNG-R1 -56C>T, IL-1 $\alpha$  +4854G>T, IL-1 $\beta$  +3954C>T, IL-1RN +2018T>C, IL-1RN VNTR, IL-2 -330T>G and TNF- $\alpha$  -308G>A.

The screening for EBV was performed in 38 out of 77 patients. EBV infection was verified in 15 out of 38 patients (39.5%). The median time to infection was 56 days following transplant and the average viral load, on the date of diagnosis, was 3.47 log cells/mL blood.

The comparison of the polymorphisms' genotypic distribution in donors and receptors revealed there are no differences in their distribution ( $p>0.05$ ), with the exception of IL-1RN VNTR ( $p<0.001$ ).

When comparing the genotypic distribution in relation to EBV infection, a slight difference in the distribution of the following polymorphisms was observed: HLA-A A>T, HcG9 A>T, IL-1 $\alpha$  +4854G>T, IL-1 $\beta$  +3954C>T and IL-2 -330T>G. Although the results are not statistically significant, the existence of a higher risk of EBV infection was observed, revealing the need to better understand and study these polymorphisms. IFNG-R1 -

56C>T polymorphism presented borderline results, in which allele C carriers present a 5-fold increased risk of developing EBV infection ( $p=0.051$ ; OR=5.00; IC95% 0.91-27.5).

This was the first study performed in a Portuguese population, addressing the development of EBV infection in transplanted patients and analysing the role of genetic polymorphisms, in inflammatory and antiviral response genes, in the susceptibility to the development of EBV infection. The results revealed the need for further studies to confirm and clarify the existence of a genetic profile of susceptibility to EBV infection, in patients who have undergone aHSCT.



## INTRODUÇÃO



## 1. Vírus *Epstein-Barr* (EBV)

### 1.1. Características gerais

O vírus *Epstein-Barr* (EBV) foi o primeiro vírus a ser isolado de um tumor em humanos, através de uma linha celular derivada de um linfoma de Burkitt (Epstein et al., 1964). É um vírus de cadeia dupla de DNA que pertence à família dos herpesvírus e à subfamília gama-herpesvírus (Dunmire, S et al., 2014; Grywalska et al., 2013; Gulley e Tang, 2010; Young e Murray, 2003). Estão descritas duas estirpes de EBV (tipo 1/A e tipo 2/B), que diferem na organização dos genes que codificam as proteínas EBNA (Antigénio nuclear do EBV) (Grywalska et al., 2013).

Estruturalmente, o EBV é composto pelo genoma e pela cápside, protegida por um envelope glicoproteico. O envelope é extremamente importante para a infeção, pois possui glicoproteínas virais na sua superfície que interagem com as células do hospedeiro (Kalinova et al., 2009; Thompson e Kurzrock, 2004).

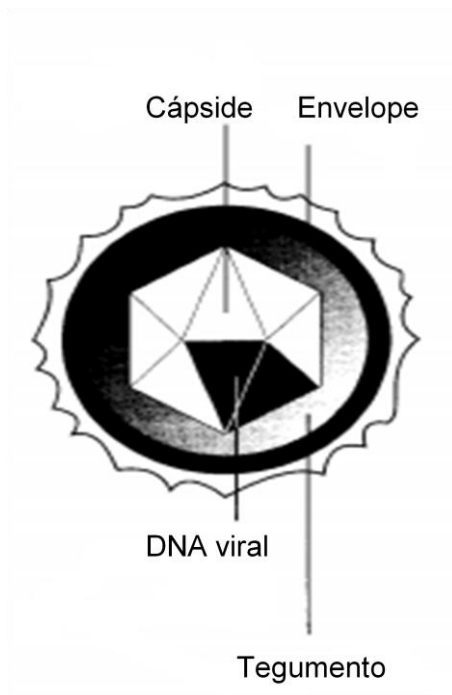


Figura 1 – Estrutura do EBV (Adaptado Klein, 1998).

### 1.2. Epidemiologia

A distribuição da infeção por EBV é muito variável, estimando-se que mais de 90% da população mundial seja serologicamente positiva, pois a infeção ocorre normalmente durante a infância. As infeções desencadeadas pelo EBV são mais prevalentes nos países em desenvolvimento, em particular nas populações com baixo nível socioeconómico. Em países desenvolvidos, a prevalência tende a aumentar gradualmente com a idade, apresentando dois picos: um entre os dois e os quatro anos e outro entre os 14 e os 18 anos. A prevalência média em crianças é de 50% e aumenta de

forma constante para um valor que varia entre 90-99% em adultos. Tanto a estirpe do tipo 1/A como a do tipo 2/B são detetadas em todo o mundo, sendo o EBV tipo 1/A o mais frequente (Dunmire, S *et al.*, 2014; Grywalska *et al.*, 2013).

Estima-se que o EBV seja o agente causador de pelo menos 1% de todos os cancros, incluindo vários linfomas, bem como do carcinoma gástrico e do carcinoma da nasofaringe (Dunmire, S *et al.*, 2014).

### **1.3. Ciclo de infeção do EBV**

Após infeção, o indivíduo torna-se portador do vírus para toda a vida, permanecendo o EBV de forma latente nas células B de memória (Grywalska *et al.*, 2013; Thompson e Kurzrock, 2004; Young e Murray, 2003). Tal como para os outros herpesvírus são conhecidas duas fases da infeção desencadeada pelo EBV: a fase lítica, que é caracterizada pela expressão de todas as proteínas e pela ativação da replicação; e a fase de latência, que envolve a infeção das células B, resultando na formação de epissomas e expressão limitada do número de proteínas virais (Grywalska *et al.*, 2013).

#### **1.3.1. Infeção primária**

O EBV pode infetar tanto células B como células T e células epiteliais (Grywalska *et al.*, 2013). Atualmente, o papel das células epiteliais não está completamente definido, mas acredita-se que estas células representam o local de infeção primária e de replicação do EBV. Desta forma, a infeção primária por EBV ocorre no epitélio da orofaringe, normalmente durante a infância, com uma replicação produtiva em células epiteliais e infeção subsequente de células B. As células B são, normalmente, infetadas através do reconhecimento pelo vírus do antígeno específico CD21 (Recetor do Complemento 2) (Grywalska *et al.*, 2013; McAulay *et al.*, 2007; Thompson e Kurzrock, 2004). Acredita-se, também, que o vírus possa atingir diretamente as células B do linfoepitélio do anel de *Waldeyer*, onde as criptas tonsilares penetram o tecido linfóide por baixo da camada epitelial, permitindo o contato direto entre as células B e o EBV. Após a infeção primária no epitélio da orofaringe, há um curto período de replicação lítica no epitélio tonsilar aumentando, assim, o número de vírus no local de infeção e propagando-se para as células epiteliais através da saliva; e um período secundário de infeção de células B *naïve* subjacentes ao local de infeção (Faulkner *et al.*, 2000; McAulay *et al.*, 2007).

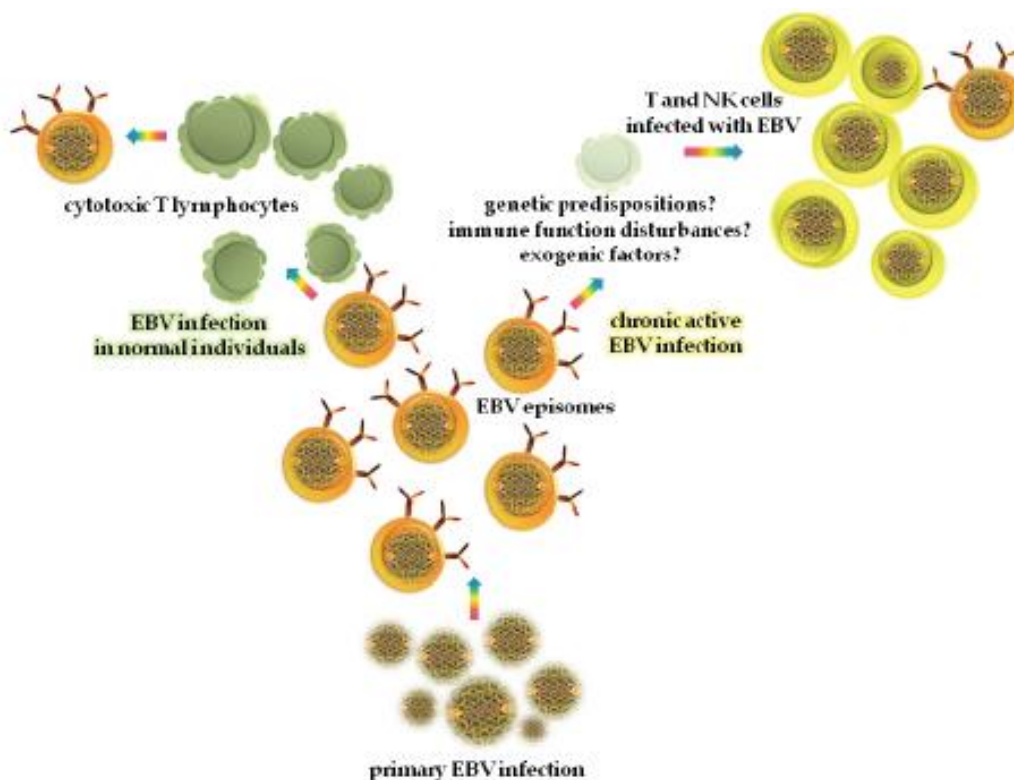


Figura 2 – Patogénese do EBV (Grywalska *et al.*, 2013).

### 1.3.2. Latência

O principal reservatório do EBV são as células B de memória, em que a infeção latente é persistente e o vírus pode ser mantido indefinidamente (Grywalska *et al.*, 2013; Thompson e Kurzrock, 2004; Young e Murray, 2003). As células B *naïve* infetadas transformam-se em células linfoblastóides, cuja proliferação é incontável e, ao mesmo tempo, diferenciam-se em células B de memória (Amon e Farrell, 2005; Callan, 2004). Algumas das células B infetadas são eliminadas pela resposta imune do hospedeiro, através das células T citotóxicas (Kuppers, 2003), outras têm a capacidade de sobreviver, devido à regulação da expressão de diferentes proteínas virais (Kuppers, 2003; Young e Rickinson, 2004).

### 1.4. Patologias associadas

O EBV está associado ao desenvolvimento de patologias benignas, como a mononucleose infecciosa (IM) e patologias malignas, como tumores de origem linfóide ou epitelial. Desta forma, o vírus contribui para a oncogénese dos seguintes tumores: linfoma de Burkitt, linfoma de células B pós-transplante, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin (origem linfóide); e carcinomas da nasofaringe, gástrico e da mama (origem epitelial) (Thompson e Kurzrock, 2004; Young e Murray, 2003). Pode então dizer-se, que as doenças hematológicas malignas associadas ao EBV afetam predominantemente as

células do tipo B. Contudo, o vírus pode estar associado a doenças raras que atingem as células T e NK (*Natural Killer*). Embora o EBV seja essencial para a tumorigénese, geralmente não é suficiente por si só. Outros fatores como a falha no reconhecimento imunológico, a estimulação da proliferação de células B e as mutações são também importantes (Grywalska *et al.*, 2013).

Em indivíduos saudáveis, o EBV é mantido de forma latente nas células B de memória, expressando apenas pequenos RNAs nucleares (EBER). Este estado é chamado de latência zero e permite a persistência do vírus de modo a que este não seja detetado pelo sistema imunológico (Grywalska *et al.*, 2013). Baseado na expressão dos genes de latência são descritos três tipos de latência, que estão associados a diferentes patologias (Figura 3) (Bar-Natan e Nagler, 2006; Capello e Gaidano, 2009; Grywalska *et al.*, 2013; Tempera *et al.*, 2011; Thompson e Kurzrock, 2004).

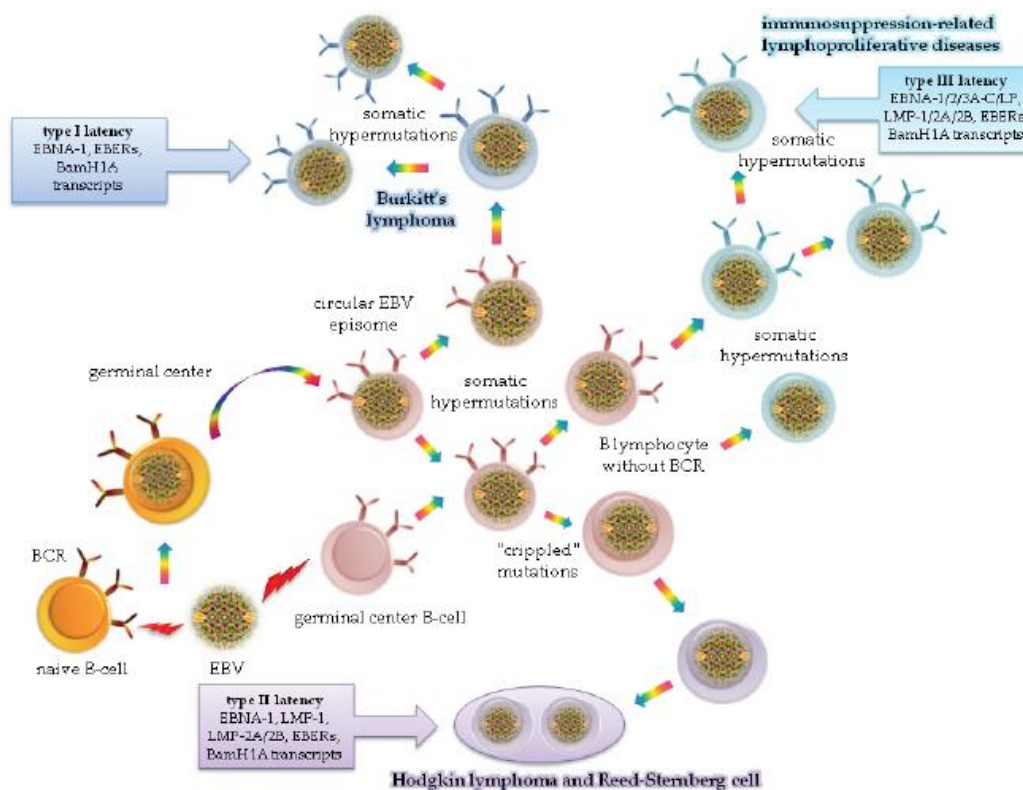


Figura 3 - Proteínas expressas nos diferentes tipos de latência e patologias (Grywalska *et al.*, 2013).

EBV-PTLD (Doença linfoproliferativa pós-transplante) está associado à latência do tipo III (Bar-Natan e Nagler, 2006). LMP1 (Proteína de membrana de latência 1) é a proteína expressa pelo EBV com maior capacidade de transformação de linfócitos B, comportando-se como um oncogene (Bar-Natan e Nagler, 2006; Kalinova *et al.*, 2009).

## 2. O EBV e o desenvolvimento de PTLT

### 2.1. EBV e transplantação de células progenitoras hematopoiéticas

O transplante de células progenitoras hematopoiéticas (HSCT) começou a ser feito na Europa há, aproximadamente, cinco décadas (Orio *et al.*, 2014). O HSCT está estabelecido como uma terapêutica padrão para uma variedade de doenças hematológicas, que podem ser benignas ou malignas (Cheuk, 2013; O' Meara *et al.*, 2014; Orio *et al.*, 2014). Existem três fontes diferentes de células progenitoras que podem ser utilizadas para o transplante, nomeadamente a medula óssea, o sangue periférico e o sangue do cordão umbilical (Cheuk, 2013). O HSCT pode ser autólogo, quando as células progenitoras provêm do próprio paciente; alogénico (aparentado ou não aparentado) quando as células progenitoras derivam de um dador consanguíneo ou de um desconhecido, previamente selecionado por testes de compatibilidade; ou singénico, quando as células progenitoras são provenientes de um gémeo idêntico (O' Meara *et al.*, 2014).

Para além da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), as duas principais causas de morte após transplante alogénico de células progenitoras hematopoiéticas (aHSCT) são a recidiva da doença e as infeções, que podem ser desencadeadas por vírus, bactérias ou fungos (Figura 4) (Fuji *et al.*, 2014; Geneugelijk *et al.*, 2014; Moss e Rickinson, 2005; Xuan *et al.*, 2012). Sabe-se que as infeções virais oportunistas especialmente, pelos herpesvírus (CMV e EBV) são uma das complicações mais comuns após aHSCT. Tanto as infeções primárias como as reativações do EBV podem levar ao desenvolvimento de doenças que ameaçam a vida dos recetores de aHSCT (Uhlín *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2012).

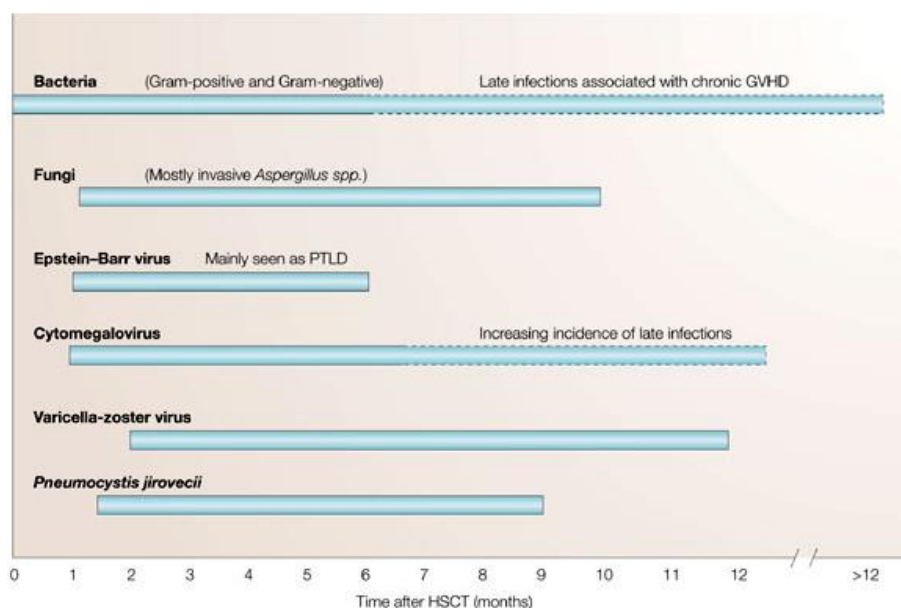


Figura 4 – Infeções desenvolvidas após HSCT (Moss e Rickinson. 2005).

## 2.2. Doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD)

A PTLD é causada na sua grande maioria pelo EBV e encontra-se subdividida em quatro tipos. Na tabela 1, encontra-se a classificação de PTLD, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Glotz *et al.*, 2012; Ibrahim e Naresh, 2012; Kalinova *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Classificação de PTLD segundo a OMS (2008)

Subtipo	Associação com EBV
Lesões precoces	EBV positivo
PTLD polimórfico	Normalmente EBV positivo
PTLD monomórfico	EBV positivo ou negativo
Linfoma de Hodgkin	Normalmente EBV positivo

A PTLD é normalmente caracterizada por uma proliferação anormal de linfócitos B (Kalinova *et al.*, 2009; Uhlin *et al.*, 2014) e ocorre após o transplante de órgãos ou de células progenitoras hematopoiéticas (Kim *et al.*, 2010; Uhlin *et al.*, 2014). Sabe-se que a infeção desencadeada pelo EBV, que ocorre nos primeiros três meses após o transplante, está fortemente associada ao desenvolvimento de PTLD em pacientes submetidos a aHSCT e que é uma das complicações mais severas após este tipo de tratamento (Reddy *et al.*, 2011; Uhlin *et al.*, 2014). A incidência de PTLD após aHSCT varia entre 0,5-1% (Gulley e Tang, 2010). Existem grupos com diferentes riscos, sendo os pacientes subdivididos em grupos de alto e baixo risco. São considerados fatores de alto risco: dador relacionado, HLA (Antigénio de histocompatibilidade leucocitária) não idêntico ao do recetor; dador não relacionado, HLA-idêntico ao do recetor; estado serológico do EBV (dador EBV positivo e recetor EBV negativo; dador EBV negativo e recetor EBV positivo); terapia imunossupressora com ATG (*Antithymocytic Globulin*) ou anti-CD3 (*Cluster of Differentiation 3*); diagnóstico de imunodeficiência primária. A incidência aumenta para 22% se o paciente apresentar pelo menos três fatores de risco (Bar-Natan e Nagler, 2006).

## 2.3. Mecanismo de evasão do EBV e desenvolvimento de PTLD

O desenvolvimento de PTLD é influenciado por diversos fatores que estão intimamente relacionados com a função imunológica (Unlin *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2012). A transformação das células B está associada à ativação e proliferação contínuas, sendo a infeção geralmente autolimitada e controlada pela resposta imune das células T, ou seja, em indivíduos imunocompetentes, a proliferação dos linfócitos B é controlada pelas células T e NK. A expressão de citocinas, como o IFN- $\gamma$  (Interferão gama), pode conduzir à ativação de células fagocíticas, nomeadamente dos macrófagos, que têm a

capacidade de fazer apresentação antígenica. Desta forma, a expressão de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e moléculas do MHC (Major de Histocompatibilidade), permite combater a infeção (Grivennikov *et al.*, 2010).

Contudo, no que diz respeito aos indivíduos imunossuprimidos, a função das células T está comprometida e o EBV induz uma expansão descontrolada dos linfócitos B (Grywalska *et al.*, 2013; Kalinova *et al.*, 2009). Assim, as células T têm um papel fulcral no desenvolvimento de PTLD, sendo que a sua disfunção é realçada devido ao facto da maior parte dos casos desta doença ocorrerem nos primeiros três meses após o transplante, isto é, quando a deficiência de células T é mais acentuada (Bar-Natan e Nagler, 2006).

Quando o ambiente imunológico não é o mais favorável ao combate do agente patogénico, este induz as células a seu favor. No que diz respeito à PTLD, na fase pós-transplante, o EBV induz as células dendríticas plasmocitóides (pDCs) a produzirem baixas concentrações de IFN- $\alpha$  (Interferão alfa) e estimula a produção da citocina imunossupressora IL-10 (Interleucina 10), permitindo que o vírus infete as células B, escapando, assim, ao reconhecimento imunológico. A IL-10 inibe a expressão de moléculas co-estimuladoras, o que se traduz numa incapacidade dos monócitos e dos macrófagos ativarem as células T. Suprime, ainda, a produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , bem como de células T e NK (Figura 5). As células T reguladoras (Treg) são células imunoreguladoras que têm a capacidade de suprimir respostas imunológicas. Quando as células Treg sofrem ativação via TCR (Recetor da célula T), estas inibem a proliferação de linfócitos T CD4 e T CD8, levando à libertação de citocinas como a IL-10. Foi demonstrado que o número de células Treg presente no microambiente tumoral de PTLD tem impacto na sobrevivência do paciente (Ibrahim e Naresh, 2012).

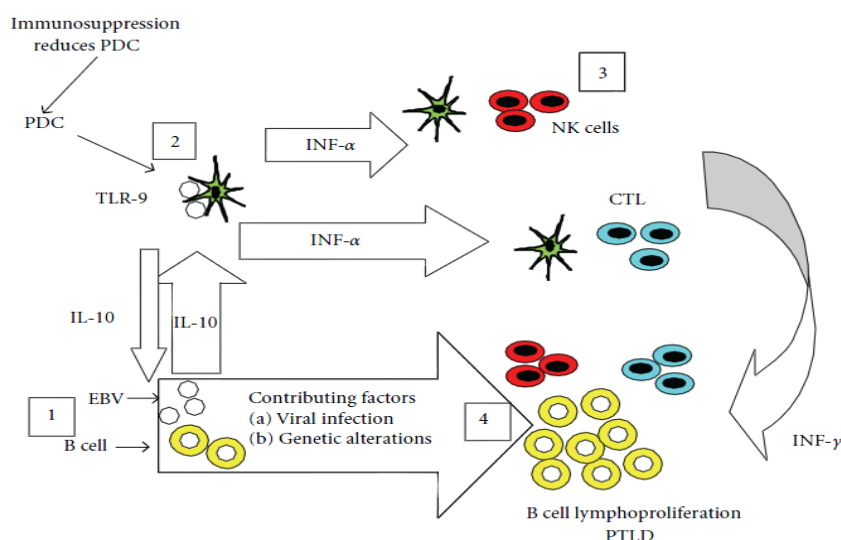


Figura 5 – Mecanismo de evasão do EBV e desenvolvimento de PTLD (Ibrahim e Naresh, 2012).

### **3. Suscetibilidade imunológica para infeção**

#### **3.1. Citocinas reguladoras da resposta imunológica**

As diferentes citocinas expressas pelo hospedeiro podem promover ou inibir o desenvolvimento e a progressão tumoral, independentemente da sua origem. Estas desempenham a função de controlar o meio imunológico e inflamatório, podendo favorecer a imunidade antitumoral ou beneficiar a progressão tumoral, tendo efeito direto no crescimento e sobrevivência das células cancerígenas (Grivennikov *et al.*, 2010). As citocinas podem ser classificadas em pró-inflamatórias como IL-1 $\alpha$  (Interleucina 1 alfa), IL-1 $\beta$  (Interleucina 1 beta), IL-2 (Interleucina 2), IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa) e anti-inflamatórias como IL-1RN (Recetor Antagonista da Interleucina 1) ou IL-10.

As citocinas pró-inflamatórias promovem a inflamação, sendo que quando administradas em humanos provocam febre, inflamação, destruição de tecido e, em alguns casos, choque e morte (Grivennikov *et al.*, 2010). A **IL-1 $\alpha$**  está envolvida na resposta imunológica, no processo inflamatório e na hematopoiese. Esta citocina é produzida por monócitos e macrófagos como uma pró-proteína, que é processada proteoliticamente e libertada em resposta à lesão celular, induzindo, assim, a apoptose (Liu *et al.*, 2013). A **IL-1 $\beta$**  é produzida por macrófagos ativados como uma pró-proteína, que é proteoliticamente processada para a sua forma ativa pela caspase 1. Esta citocina é um importante mediador da resposta inflamatória e está envolvida numa variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação, a diferenciação e a apoptose (Liu *et al.*, 2013). A **IL-2** desempenha um papel importante na proliferação dos linfócitos T ativados, permitindo a ativação dos fagócitos e dos linfócitos B para a produção de anticorpos. Tem um papel central no aumento da ativação da morte celular induzida dos linfócitos T, eliminando, assim, as células autorreativas e promovendo o fim da resposta dos linfócitos T, através da indução da produção de células T supressoras (Christensen *et al.*, 2006). O **IFN- $\gamma$**  apresenta propriedades antivirais, imunoreguladoras e antitumorais. Para além disso, é um potente ativador de macrófagos, células responsáveis pela ativação da imunidade (Dierksheide *et al.*, 2005). O **TNF- $\alpha$**  é secretado, principalmente, por macrófagos e regula a proliferação e a diferenciação celular; induz a apoptose, o metabolismo lipídico e a coagulação (Rodríguez *et al.*, 2012).

As citocinas anti-inflamatórias são moléculas imunoreguladoras que controlam a resposta das citocinas pró-inflamatórias (Sultani *et al.*, 2012). A **IL-1RN** inibe a atividade da IL-1 $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  e modula uma variedade de IL-1 que estão relacionadas com as respostas imune e inflamatória. Esta citocina evita danos celulares nos casos em que a resposta inflamatória é severa e prolongada e pode, também, ser utilizada para seguir a resposta imune, uma vez que os seus níveis aumentam durante os passos finais da



resposta inflamatória (Sousa *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2013). A **IL-10** tem efeitos pleiotrópicos na imunorregulação e inflamação, através da diminuição da expressão de citocinas Th1 (T auxiliar 1), antígenos de MHC classe II e moléculas co-estimuladoras dos macrófagos. Adicionalmente, a IL-10 aumenta a sobrevivência das células B, a proliferação e produção de anticorpos (Liu *et al.*, 2011).

### **3.2. Resposta imunológica às infeções virais**

Os vírus infetam uma ampla variedade de células usando moléculas de superfície celular, como os recetores, para entrarem na célula do hospedeiro. O uso de recetores específicos determina o tropismo dos vírus. Após a sua entrada nas células, os vírus interferem com a síntese e a função das proteínas, podendo levar à lise das células infetadas. A resposta imune do hospedeiro contra os vírus destina-se a bloquear a infeção e a eliminar as células infetadas. Contudo, os vírus possuem mecanismos capazes de evadir essa resposta (Mogensen, 2009; Swain *et al.*, 2012).

#### **3.2.1. Resposta imune inata**

Após a entrada dos vírus no hospedeiro, estes são reconhecidos por PRR (*Pattern Recognition Receptors*) expressos por células do sistema imune inato e células epiteliais, como os TLR (*Toll-like Receptor*). A ligação ao TLR induz um aumento da concentração do NF- $\kappa$ B (Fator nuclear kappa B), envolvido na transcrição de genes associados à resposta inflamatória. Nas células dendríticas e nos macrófagos, há produção de citocinas como a IL-12 (Interleucina 12), que desempenha um papel importante na diferenciação das células T auxiliares (Th). Estas células, por sua vez, produzem IFN- $\gamma$ , uma citocina com propriedades antivirais (Akira, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Mogensen, 2009; Paludan *et al.*, 2011; Pang e Iwasaki, 2012; Yokoyama e Colonna, 2008).

Os mecanismos mais imediatos que o hospedeiro desencadeia contra a infeção viral são a inibição da replicação viral por interferões do tipo I, como o IFN- $\alpha$  e o IFN- $\beta$  (Interferão beta) e, a morte das células infetadas pelas células NK. Os vírus estimulam a produção de diversas citocinas, como o TNF- $\alpha$ , as quais induzem uma resposta inflamatória no local de infeção. Devido à produção das diversas citocinas, as células NK são ativadas, aumentando a sua capacidade citolítica. Por isso, estas células representam um importante mecanismo antiviral em estadios precoces da infeção (Akira, 2011; Guan *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Mogensen, 2009; Paludan *et al.*, 2011; Pang e Iwasaki, 2012).

### **3.2.2. Resposta imune adaptativa**

A indução de respostas imunes específicas requer a apresentação dos antígenos virais por células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas. Alguns vírus podem infectar diretamente estas células, outros não. Neste último caso, os peptídeos antígenicos são apresentados às células T CD4, associados a moléculas do MHC classe II. As células T são ativadas, contribuindo para a estimulação de células B e células T CD8. A resposta pode, também, ser mediada por anticorpos que bloqueiam a ligação do vírus às células do hospedeiro e por linfócitos T citotóxicos (CTL) que lisam as células infectadas. Quando a infeção está estabelecida, ou seja, quando o vírus já se encontra no interior das células, a resposta imune mediada por células é a que apresenta maior eficácia na defesa do hospedeiro, sendo as CTL e as Th os principais componentes na defesa antiviral (Mogensen, 2009; Münz, 2014; Pang e Iwasaki, 2012; Swain *et al.*, 2012).

#### **4. Suscetibilidade genética para infeções virais**

A predisposição genética do hospedeiro para desenvolver infeção por EBV pode envolver múltiplos genes e respetivos polimorfismos (McAulay *et al.*, 2009). Os polimorfismos genéticos são caracterizados por variações na sequência de DNA, sendo que a variante menos frequente está presente em pelo menos 1% da população (Brookes, 1999). Estudos recentes têm demonstrado a importância dos polimorfismos, nomeadamente de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), em citocinas que podem influenciar o *outcome* da infeção por EBV em doentes transplantados (Morscio *et al.*, 2013). Os SNPs são os polimorfismos mais comuns e consistem numa alteração que ocorre num único nucleótido da sequência genómica. Acredita-se que os SNPs são responsáveis por cerca de 90% das variações genéticas que ocorrem nos humanos. Estas alterações são capazes de conferir variações na suscetibilidade genética de cada indivíduo para uma determinada doença (Chakravarti, 2001). Para além dos SNPs, existem repetições em cadeia de DNA que estão divididas em duas classes: microssatélites, que têm tamanhos de padrão curto; minissatélites que apresentam padrões mais longos. Os VNTR (Número variável de repetições em série) constituem, aproximadamente, 10% do genoma; exibem uma enorme variabilidade e são constituídos por 9-100 bp (pares de bases) repetidos sequencialmente. São locais em que o número de cópias internas na repetição varia na população (Gelfand *et al.*, 2014).

Desta forma, a análise dos polimorfismos e o estudo dos perfis genéticos são importantes, pois permitem identificar os indivíduos que apresentam maior risco para o desenvolvimento de uma doença. Assim, torna-se importante estudar o papel dos polimorfismos em genes de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no desenvolvimento de infeção por EBV.

##### **4.1. Polimorfismo CR2 +24T>C (rs3813946)**

O gene CR2 encontra-se no braço longo do cromossoma 1 e expressa a proteína CD21 (Recetor do Complemento 2), desempenhando um papel central no reconhecimento do EBV e na mediação da resposta imunológica (Cooper *et al.*, 1990; Fan *et al.*, 2013). Foi descrito que este recetor celular (CR2/CD21) é um dos responsáveis pelo reconhecimento da glicoproteína g350/220, o principal antígeno de superfície do EBV (Young *et al.*, 2007). Recentemente foi descrito um polimorfismo (rs3813946) caracterizado pela variação T>C na posição +24 da região promotora 5'-UTR do gene CR2, tendo sido descrito como capaz de alterar a expressão de CR2/CD21 (Cruickshank *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2013). Alguns estudos têm demonstrado a associação deste polimorfismo como possível marcador de suscetibilidade para o desenvolvimento de carcinoma da nasofaringe (Fan *et al.*, 2013).

#### **4.2. Polimorfismo HLA-A (rs2530388)**

O gene HLA-A pertence ao HLA classe I e está localizado no braço curto do cromossoma 6 (McAulay *et al.*, 2007). As moléculas de classe I desempenham um papel central no sistema imunitário, uma vez que fazem a apresentação de péptidos, pelo que a sua função no reconhecimento de antígenos do EBV poderá ser determinante para o desenvolvimento de uma resposta imunológica eficaz. O polimorfismo rs2530388 é caracterizado por uma variação A>T numa região intergénica (não-codificante) do gene HLA-A (McAulay *et al.*, 2007). Recentemente, um estudo demonstrou que este SNP parece estar associado ao desenvolvimento de linfoma de Hodgkin EBV positivo (Niens *et al.*, 2006). Adicionalmente foi ainda demonstrado que o alelo A está associado ao desenvolvimento de IM, sendo considerado um fator de risco para o desenvolvimento de patologias associadas ao EBV (McAulay *et al.*, 2007).

#### **4.3. Polimorfismo HcG9 (rs6457110)**

O gene HcG9 está localizado no braço curto do cromossoma 6, encontrando-se dentro da região do MHC classe I (McAulay *et al.*, 2007). Acredita-se que este gene seja não-codificante, contudo a sua função ainda não foi bem estudada (McAulay *et al.*, 2007). O polimorfismo rs6457110 é caracterizado por uma variação A>T numa região intergénica (não-codificante) e tem sido sugerido como associado ao desenvolvimento de linfoma de Hodgkin EBV positivo (Niens *et al.*, 2006). Para além disso, o alelo T parece estar associado ao desenvolvimento de IM (McAulay *et al.*, 2007).

Este polimorfismo tem sido estudado em conjunto com o polimorfismo rs2530388 do HLA-A e os estudos revelam que o haplótipo AA é mais comum em indivíduos com IM EBV-positivos do que em indivíduos seronegativos (McAulay *et al.*, 2007).

#### **4.4. Polimorfismo IFNG-R1 -56C>T (rs2234711)**

O recetor do IFN- $\gamma$  é um heterodímero constituído pela subunidade IFNG-R1 e pela subunidade IFNG-R2, produzido durante a resposta imunológica mediada por células T e NK, ativando a expressão de moléculas do sistema MHC classe II e a libertação de mediadores inflamatórios (Cheong *et al.*, 2006; Malmgaard, 2004). O gene IFNGR1 encontra-se no braço longo do cromossoma 6 e codifica a cadeia de ligação ao ligando (alfa) do recetor do IFN- $\gamma$  (Bulat-Kardum *et al.*, 2006; He *et al.*, 2009; Yancoski *et al.*, 2012), sendo que a atividade desta subunidade tem sido associada ao desenvolvimento de infeções microbianas (Fraser *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2002; Mohamed *et al.*, 2003; Salih *et al.*, 2007). Tem sido descrita a existência de vários polimorfismos neste gene, sendo um dos mais comuns o polimorfismo rs2234711, caracterizado pela variação C>T na posição -56 da região promotora do gene IFNGR1

(Hauptstschlein *et al.*, 1992; He *et al.*, 2009). Vários estudos sugerem que estas alterações podem afetar a transcrição do gene, sendo que o alelo T está associado a menor expressão da subunidade IFNG-R1 e, conseqüentemente, menor atividade do IFN- $\gamma$ , favorecendo a modificação da resposta imunológica de Th1 para Th2 (Thye *et al.*, 2003; Tiroch *et al.*, 2005). Mais recentemente este polimorfismo foi associado à suscetibilidade para infecção por *Helicobacter pylori*, que pode levar ao desenvolvimento precoce de cancro gástrico (Canedo *et al.*, 2008).

#### **4.5. Polimorfismo IL-1 $\alpha$ +4854G>T (rs17561)**

O gene IL1A encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 2, sendo responsável pela expressão da citocina IL-1 $\alpha$ , que desempenha um papel importante na mediação da inflamação bem como na iniciação da resposta imune contra vírus (Liu *et al.*, 2013). Um dos polimorfismos mais estudados é o rs17561, caracterizado pela variação G>T na posição +4854 do gene IL1A. Contudo, o mecanismo do papel funcional deste SNP ainda não foi identificado (Li *et al.*, 2014). Este polimorfismo tem sido associado a doenças inflamatórias, refletindo um aumento de produção de IL-1 $\alpha$  em indivíduos portadores do alelo T (Li *et al.*, 2014). Este polimorfismo tem sido, ainda, associado a diversas patologias, nomeadamente ao carcinoma do ovário (Li *et al.*, 2014) e ao carcinoma gástrico (Durães *et al.*, 2014).

#### **4.6. Polimorfismo IL-1 $\beta$ +3954C>T (rs1143634)**

O gene IL1B está localizado no braço longo do cromossoma 2 e expressa a citocina IL-1 $\beta$ , que desempenha uma função semelhante à da IL-1 $\alpha$  no processo de inflamação e na imunidade (Liu *et al.*, 2013). A produção de IL-1 $\beta$  é um importante fator de iniciação na cascata de eventos que resultam na inflamação. Níveis elevados desta citocina no soro e no fígado têm demonstrado inibir a ativação de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , bem como a atividade antiviral (Omran *et al.*, 2013). O polimorfismo rs1143634 é caracterizado pela variação C>T na posição +3954 do gene IL1B e parece afetar a expressão do gene (Chen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013). Vários trabalhos demonstram que este polimorfismo pode estar relacionado com a ocorrência de diversos cancros, como por exemplo o cancro da mama (Pooja *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

#### **4.7. Polimorfismos IL-1RN**

O antagonista do recetor da interleucina 1 (IL1-Ra) é uma citocina anti-inflamatória expressa pelo gene IL1RN que se encontra no braço longo do cromossoma 2 (Korthagen *et al.*, 2012). A IL-1RN compete com a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  pelo recetor IL-1 das células, impedindo a transmissão de sinais pró-inflamatórios (Granowitz *et al.*, 1991). Para além

disso, a IL-1RN evita danos celulares no caso de uma inflamação grave e prolongada e pode, também, ser utilizada para seguir a resposta imune, uma vez que os seus níveis aumentam durante as etapas finais da resposta inflamatória (Dinarello, 1991; Hurme e Santtila, 1998; Witkin *et al.*, 2002).

A literatura refere a existência de vários polimorfismos na sequência do gene IL-1RN e apesar de a maioria serem SNPs, grande parte dos estudos concentram-se num número variável de repetições em série (VNTR) (Sousa *et al.*, 2013). Estas variações são, ainda, capazes de modular a eficácia da sinalização das citocinas e, desta forma, aumentar a predisposição para a doença (Korthagen *et al.*, 2012).

Entre os polimorfismos mais estudados encontra-se um VNTR caracterizado por uma variação de 86 bp no intrão 2 (Sousa *et al.*, 2012) e o rs419598 (IL-1RN +2018T>C) caracterizado pela variação T>C na posição +2018 do gene IL1RN (Korthagen *et al.*, 2012).

Tem sido descrito que estes polimorfismos podem afetar a expressão do gene tendo, por isso, um papel importante no desenvolvimento de patologias inflamatórias (Maruta *et al.*, 2008; McIntyre *et al.*, 1991) e vários cancros (nomeadamente gástrico, esófago, bexiga, mama, colorectal, pulmão, colo do útero e nasofaringe) (Burada *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2013).

#### **4.8. Polimorfismo IL-2 -330 T>G (rs2069762)**

O gene IL2 encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 4 e codifica a IL-2, uma citocina importante na proliferação de linfócitos T e B e, considerada essencial na resposta imune a estímulos antigénicos (Guma *et al.*, 2014).

O polimorfismo rs2069762 é caracterizado pela variação T>G na posição -330 do gene IL2 (Fichna *et al.*, 2013). Este polimorfismo está associado, maioritariamente, a doenças autoimunes, bem como a condições alérgicas (Fichna *et al.*, 2013). No entanto, foi relacionado com outros fenómenos imunológicos, como o risco de desenvolvimento de GVHD em doentes submetidos a HSCT (Fichna *et al.*, 2013; Harkensee *et al.*, 2012).

#### **4.9. Polimorfismo TNF- $\alpha$ -308G>A (rs1800629)**

O gene TNFA está localizado no braço curto do cromossoma 6 e codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional, TNF- $\alpha$ , que está envolvida na regulação de um largo espectro de processos biológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo de lípidos e coagulação (Hajeer e Hutchinson, 2001; Rodríguez *et al.*, 2012). Esta citocina tem sido implicada numa variedade de doenças, incluindo doenças auto-imunes (Durães *et al.*, 2014).

O polimorfismo rs1800629 é caracterizado pela variação G>A na posição -308 do gene TNF- $\alpha$  (Ardebili *et al.*, 2011). Este polimorfismo está associado ao desenvolvimento de cancro gástrico, colo do útero e nasofaringe (Duarte *et al.*, 2005; Gorouhi *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2012). Um estudo demonstrou, ainda, que a variação G>A no gene TNFA parece estar associada a linfoma de Hodgkin EBV negativo (Ghesquières *et al.*, 2013). Para além disso, pode aumentar o risco de desenvolvimento de GVHD em doentes submetidos a aHSCT (Hansen, 2008).



## OBJETIVOS



## **OBJETIVOS**

O principal objetivo deste estudo era definir um perfil genético de suscetibilidade imunológica para infeção por EBV em doentes submetidos a aHSCT. Para tal foram definidos objetivos específicos:

- Caracterizar a infeção por EBV em doentes submetidos a aHSCT;
- Caracterizar a presença de polimorfismos genéticos em genes envolvidos na resposta imunológica em doentes e dadores de aHSCT;
- Comparar o perfil genético entre doentes e dadores e associação com infeção por EBV,



## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **1. Tipo de estudo e população**

Foi desenvolvido um estudo retrospectivo em pacientes (n=77) com diferentes doenças hematológicas submetidos a aHSCT no Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO do Porto) e respetivos dadores (n=77). Os dados clínico-patológicos dos doentes (idade, sexo, doença, grupo sanguíneo, estado serológico do EBV), dos dadores (sexo, grupo sanguíneo, relação com doente), relativos ao transplante (tipo de regime de condicionamento, fonte de células progenitoras e compatibilidade HLA) e relativos à infeção por EBV (pesquisa de EBV no sangue e data resultado positivo) foram coletados a partir de registos clínicos individuais e inseridos numa base de dados com codificação única.

### **Procedimentos de transplantação**

Os transplantes foram realizados de acordo com os protocolos institucionais, tendo como base os padrões internacionais para aHSCT. Resumidamente, o regime mieloblástico foi baseado em busulfano e ciclofosfamida, enquanto o condicionamento de intensidade reduzida (RIC) baseou-se numa dose mais reduzida de busulfano e fludarabina. Os pacientes com dadores não idênticos ou não relacionados receberam ATG, como parte do regime de condicionamento. A profilaxia do GVHD em pacientes com regime mieloblástico consistiu numa combinação de um inibidor da calcineurina ou ciclosporina (CsA) ou Tacrolimus e um metotrexato (MTX). Os pacientes em RIC receberam CsA ou Tacrolimus mais micofenolato mofetil (MMF).

### **Deteção de EBV**

A detecção de EBV foi realizada em amostras de sangue periférico dos doentes utilizando a tecnologia por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real quantitativo, usando o kit *EBV Real Time* (ELITech Group®, Puteaux, France).

### **Definição das variáveis colhidas**

As doenças hematológicas foram classificadas nas seguintes categorias: 1) leucemias agudas (leucemia mieloide aguda, leucemia linfóide aguda); 2) doenças mieloproliferativas crónicas (leucemia mieloide crónica, policitemia vera, mielofibrose); 3) doenças linfoproliferativas crónicas (linfoma de células B, linfoma de células T, mieloma múltiplo, leucemia linfóide crónica); 4) síndrome mielodisplásica (leucemia mielomonocítica crónica); 5) anemia aplásica (anemia de Fanconi, disceratose congénita, síndrome de Diamond-Blakfan); 6) outros (doença metabólica, hemoglobinopatias).

A compatibilidade HLA foi classificada como HLA-idêntico se existiam 10/10 marcadores idênticos e HLA-não idêntico (se 9/10).

O estado serológico do EBV foi caracterizado como: 1) infecção antiga se IgG EBV VCA positivo e IgM EBV VCA negativo; e 2) suscetível se IgG EBV VCA negativo e IgM EBV VCA negativo. A presença de infecção por EBV foi definida após a deteção de um resultado positivo (>100 cópias/mL) no teste de diagnóstico como indicador da presença de EBV em circulação. O tempo até infecção por EBV foi calculado através da diferença entre a data do resultado positivo para EBV no sangue periférico e a data do transplante.

## 2. Colheita e processamento de amostras

As amostras de sangue periférico de doentes e dadores foram obtidas a partir de amostras enviadas para o Serviço de Hematologia do IPO Porto para estudo do quimerismo. As amostras foram processadas para extração total de ácidos nucleicos (NA) utilizando o *kit QIAmp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Heidelberg, Germany). As amostras extraídas foram preservadas à temperatura de -20 °C e a qualidade e integridade de DNA/RNA foram analisadas usando o espectrofotómetro NanoDrop® 1000 v3.7 (Thermo Scientific, Wilmington DE, EUA).

## 3. Genotipagem

As análises dos perfis genéticos dos pacientes submetidos a aHSCT e dos indivíduos saudáveis permitiram determinar quais os pacientes mais propensos a desenvolver infecção por EBV e que apresentam maior predisposição para desenvolver PTLT. Os polimorfismos foram selecionados a partir de regiões polimórficas HLA e regiões não-HLA, incluindo genes de resposta imune do hospedeiro. A genotipagem foi realizada através de procedimentos adequados de acordo com a literatura – Tabela 2.

Tabela 2 – Polimorfismos genéticos e diferentes técnicas de análise

Gene	rs	SNP	Método
CR2	rs3813946	+24T>C	PCR em tempo real
HLA-A	rs2530388	A>T (região intergénica)	PCR em tempo real
HcG9	rs6457110	A>T (região intergénica)	PCR em tempo real
IFNG-R1	rs2234711	-56C>T	PCR em tempo real
IL-1α	rs17561	A114S	PCR em tempo real
IL-1β	rs1143634	+3954C>T	PCR em tempo real
IL-1RN	rs419598	+2018T>C	PCR em tempo real
IL-2	rs2069762	-330T>G	PCR em tempo real
IL-1RN	-	VNTR	PCR
TNF-α	rs1800629	-308G>A	PCR em tempo real

### 3.1. Protocolos *Alele Specific Real-Time PCR* (AS RT-PCR)

Os SNPs rs3813946, rs2530388, rs6457110, rs2234711, rs17561, rs114634, rs419598, rs2069762, rs1800896, rs1800629 foram analisados por PCR em tempo real.

Tabela 3 – Polimorfismos genéticos estudados por AS RT-PCR

Gene	rs	SNP	Assay
CR2	rs3813946	+24T>C	c__25599654_10
HLA-A	rs2530388	A>T (região intergénica)	c__2437583_10
HcG9	rs6457110	A>T (região intergénica)	c__11195827_10
IFNG-R1	rs2234711	-56C>T	c__11693991_10
IL-1 $\alpha$	rs17561	A114S	c__9546471_10
IL-1 $\beta$	rs1143634	+3954C>T	c__9546517_10
IL-1RN	rs419598	+2018T>C	c__8737990_10
IL-2	rs2069762	-330T>G	c__15859930_10
TNF- $\alpha$	rs1800629	-308G>A	c__7514879_10

A reação foi realizada num volume final de 7  $\mu$ L que continha 2  $\mu$ L de DNA, 2,375  $\mu$ L de água bidestilada, 2,5  $\mu$ L de *TaqMan Universal Master Mix II* (Applied Biosystems, Foster City, California), 0,125  $\mu$ L de assay (Applied Biosystems, Foster City, California). A reação foi realizada numa microplaca, de acordo com as seguintes condições: 95 °C durante 10 minutos; 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto (45 ciclos). O produto de PCR foi detetado por um aumento de fluorescência, usando o sistema de PCR em tempo real 7300 da Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, California). Numa primeira fase, fez-se a discriminação alélica para cada uma das amostras (Figura 6) e, posteriormente, confirmou-se o genótipo através da análise da curva de amplificação do sinal de fluorescência (Figura 7).

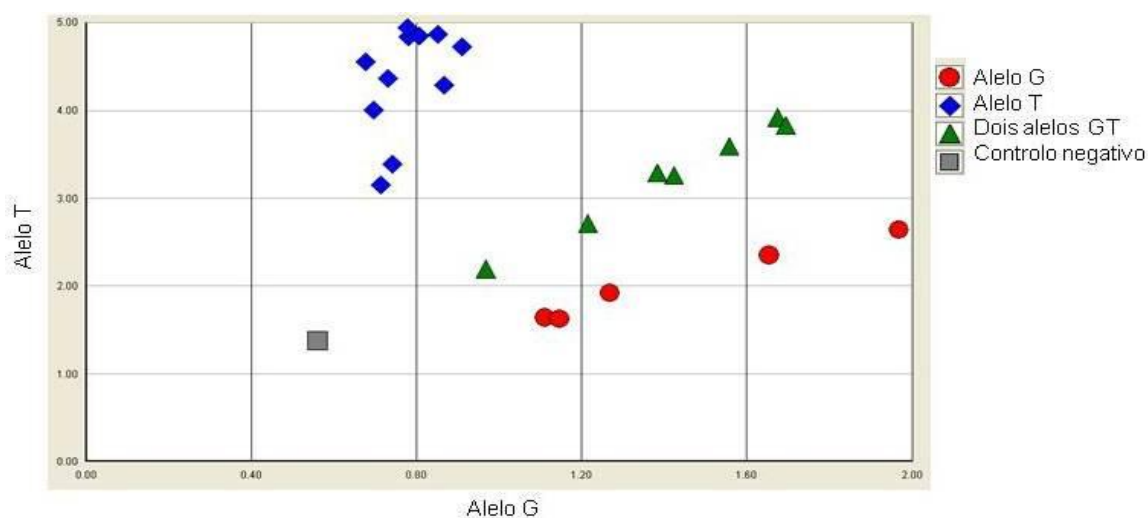


Figura 6 – Imagem representativa da discriminação alélica para o polimorfismo IL-2 -330T>G (rs2069762).

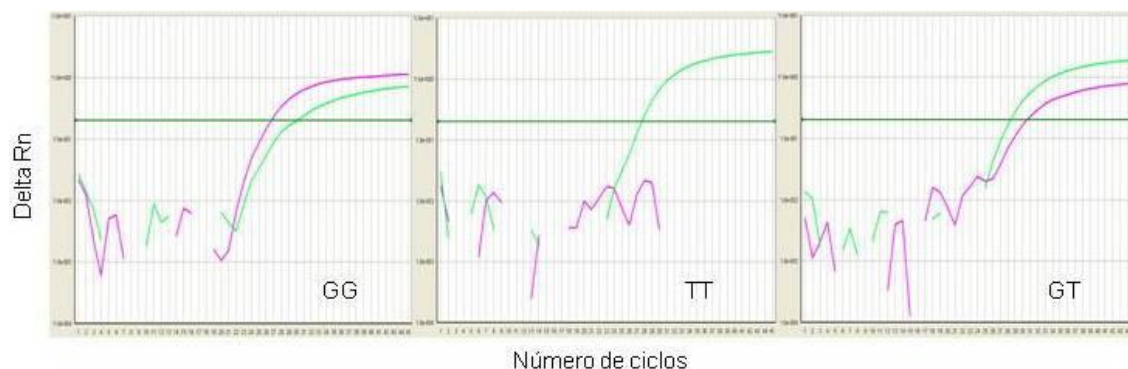


Figura 7 - Imagem representativa da deteção dos diferentes genótipos para o polimorfismo IL-2 -330T>G (rs2069762) por PCR em tempo real, com demonstração das curvas de amplificação das amostras.

### 3.2. Protocolo IL-1RN VNTR

A genotipagem do polimorfismo do IL-1RN VNTR foi feita pela técnica de PCR com o *primer forward* 5'- CCC CTC AGC AAC ACT CC -3' e o *primer reverse* 5'- GGT CAG AAG GGC AGA G -3', de acordo com o sugerido por Sousa *et al.* (2013). A amplificação foi feita numa reação com volume total de 50  $\mu$ L contendo 2  $\mu$ L de amostra e 1x *DreamTaq green buffer*, 0,4 mM de dNTPs, 0,3 mM de cada *primer* e 1 U de *DreamTaq* DNA polimerase. As condições de amplificação foram: pré-desnaturação do DNA durante 4 minutos a 94 °C para ativação da enzima, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, *annealing* a 57 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 60 segundos, com um passo de extensão final durante 5 minutos a 72 °C. Existem cinco produtos de amplificação possíveis: alelo 1 (410 bp), alelo 2 (240 bp), alelo 3 (325 bp), alelo 4 (500 bp) e alelo 5 (595 bp). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese num gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. As diferentes combinações possíveis de genótipos são; A1\*A1, A1\*A2, A1\*A3, A1\*A4, A1\*A5, A2\*A2, A2\*A3, A2\*A4, A2\*A5, A3\*A3, A3\*A4, A3\*A5, A4\*A4, A4\*A5 e A5\*A5 (Sousa *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2013) (Figura 8).

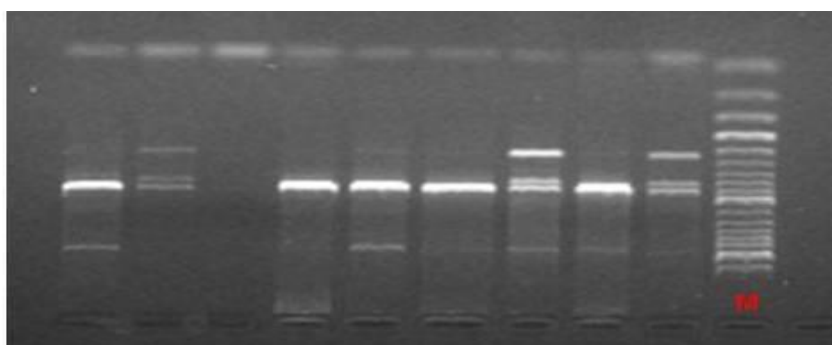


Figura 8 - Imagem representativa de alguns dos diferentes genótipos possíveis para o polimorfismo IL-1RN VNTR (M: marcador molecular de 50 bp).

#### **4. Controlo de qualidade**

A deteção dos polimorfismos foi realizada sem discriminação das amostras e os resultados analisados independentemente por dois autores. Foram selecionadas aleatoriamente 10% de todas as amostras, sendo estas submetidas novamente a uma amplificação para confirmar os resultados. Em todas as reações foram utilizados controlos negativos de amplificação, utilizando água bidestilada em substituição de DNA.

#### **5. Questões Éticas**

Este estudo não interferiu com os procedimentos de rotina decididos pelos médicos. As amostras estudadas foram enviadas para rotina para o Serviço de Hematologia do IPO do Porto

#### **6. Análise estatística**

A análise estatística dos resultados foi efetuada com o software *IBM® SPSS Statistics for Macintosh, Versão 20.0* (IBM Copr, Armonk, NY USA). Foi testado o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para verificar se as frequências obtidas eram ou não semelhantes às descritas para a população geral ([www.had2know.com](http://www.had2know.com)). Foi utilizado o teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) ou o *Fisher's exact test* para comparar as variáveis categóricas utilizando um nível de significância de 5%. O cálculo do *Odds Ratio* (OR) e o intervalo de confiança a 95% (IC95%) permitiram medir a associação entre as variáveis.



## RESULTADOS



## 1. Caracterização da população do estudo

### 1.1. Caracterização dos doentes submetidos a aHSCT

A população em estudo incluiu 77 pacientes com diferentes doenças hematológicas submetidos a aHSCT cujas variáveis clínico-patológicas estão descritas na tabela 4. A população era constituída por 32 doentes do género feminino e 45 do género masculino, com idade média de  $40,6 \pm 17,5$  anos e mediana de 47 anos (Figura 9). Quanto ao diagnóstico, as patologias mais comuns foram as leucemias agudas (53,2%) incluindo a leucemia mieloide aguda (27,3%) e a leucemia linfóide aguda (23,4%). Os tipos sanguíneos mais frequentes foram o A Rh+ (41,6%) e o O Rh+ (35,1%).

Relativamente ao estado serológico do EBV, a maioria dos pacientes apresentou sinais de infeção antiga (92,2%), sendo que apenas 7,8% dos pacientes seria suscetível ao desenvolvimento de infeção por EBV.

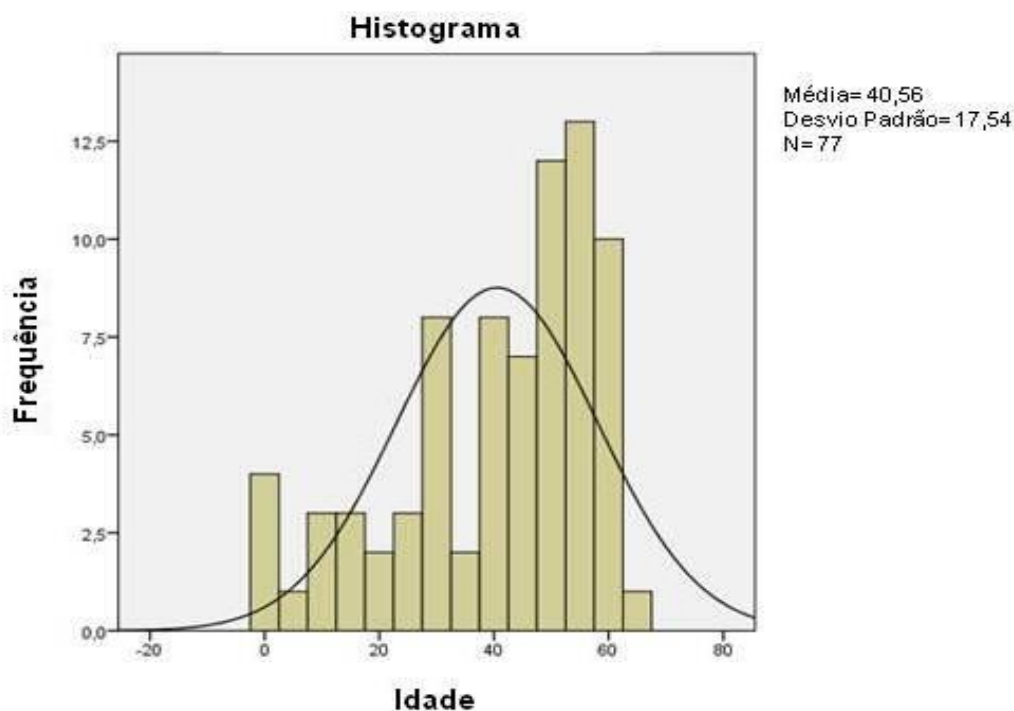


Figura 9 – Gráfico representativo da distribuição das idades dos doentes.

Tabela 4 – Caracterização dos doentes submetidos a aHSCT

Variáveis	n (%)
<b>Género (n=77)</b>	
Feminino	32 (41,6)
Masculino	45 (58,4)
<b>Diagnóstico (n=77)</b>	
Aplasia Medular	7 (9,1)
Doença de Hodgkin	1 (1,3)
Imunodeficiência primária	1 (1,3)
Leucemia Linfoide Aguda	18 (23,4)
Leucemia Linfoide Crónica	6 (7,8)
Leucemia Mieloide Aguda	21 (27,3)
Leucemia Mieloide Crónica	2 (2,6)
Leucemias Agudas – Outras	2 (2,6)
Linfocitose Hemofagocítica Familiar	1 (1,3)
Linfoma Não-Hodgkin	7 (9,1)
Metabólicas	1 (1,3)
Mieloma Múltiplo	2 (2,6)
Síndrome Mielodisplásico/ Mieloproliferativo	8 (10,4)
<b>Patologia (n=77)</b>	
Anemia Aplástica	7 (9,1)
Doenças Linfoproliferativas Crónicas	16 (20,8)
Doenças Mieloproliferativas Crónicas	2 (2,6)
Leucemias Agudas	41 (53,2)
Síndromes Mielodisplásicos/ Mieloproliferativos	8 (10,4)
Outras	3 (3,9)
<b>Tipo sanguíneo (n=77)</b>	
A Rh-	6 (7,8)
A Rh+	32 (41,6)
A/O Rh-	1 (1,3)
AB Rh+	1 (1,3)
B Rh+	5 (6,5)
O Rh-	5 (6,5)
O Rh+	27 (35,1)
<b>Estado serológico do EBV (n=77)</b>	
Suscetível	6 (7,8)
Infeção antiga	71 (92,2)

## 1.2. Caracterização dos dadores de células progenitoras hematopoiéticas

Este estudo incluiu amostras de 77 dadores de células progenitoras hematopoiéticas, cujas variáveis clínico-patológicas relevantes estão descritas na tabela 5. A população era constituída por 38 dadores do género feminino e 39 do género masculino, com idade média de  $39,4 \pm 13,5$  anos e mediana de 40 anos (Figura 10). No que diz respeito ao tipo sanguíneo, o tipo mais comum foi o A Rh- (84,4%); e a maioria dos dadores eram aparentados (63,6%).

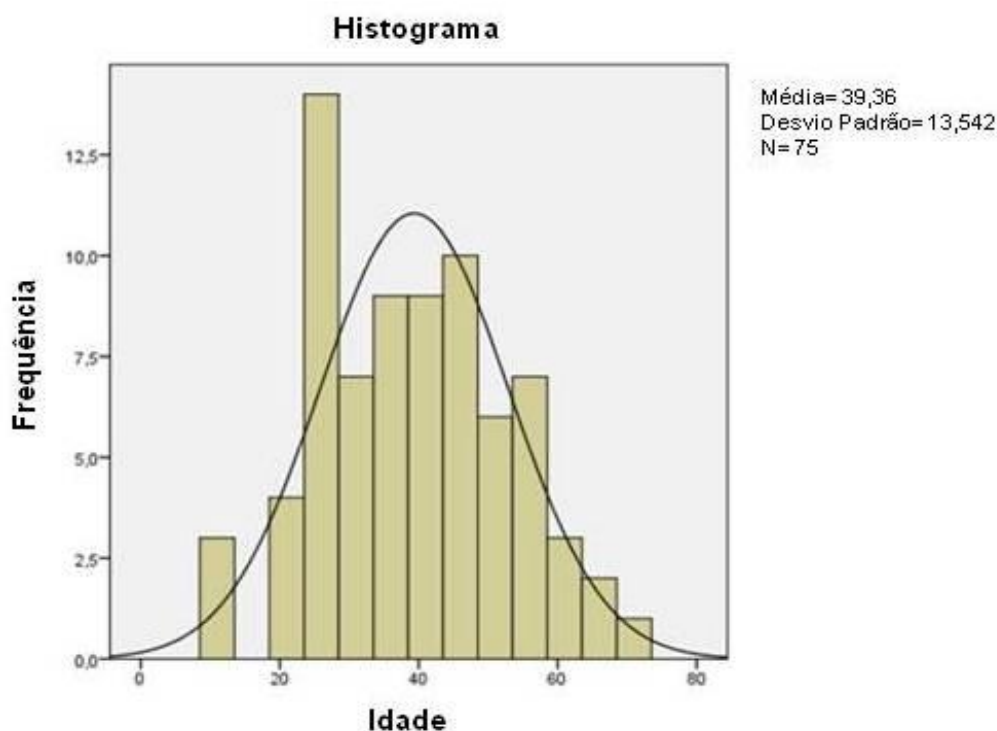


Figura 10 – Gráfico representativo da distribuição das idades dos dadores.

Tabela 5 – Caracterização dos dadores de células progenitoras hematopoiéticas

Variáveis	n (%)
<b>Género (n=77)</b>	
Feminino	38 (49,4%)
Masculino	39 (50,6%)
<b>Tipo sanguíneo (n=77)</b>	
A Rh-	65 (84,4%)
A Rh+	11 (14,3%)
O Rh+	1 (1,3%)
<b>Relação Dador-Recetor (n=77)</b>	
Aparentado	49 (63,6%)
Não Aparentado	28 (36,4%)

### 1.3. Caracterização dos transplantes

Neste estudo, a maioria dos doentes foi submetida a transplante de células progenitoras hematopoiéticas a partir de dadores HLA-idênticos (80,5%), tendo sido utilizada como fonte de células progenitoras a medula óssea em apenas 11 casos (14,3%) e o sangue periférico em 66 casos (85,7%). Relativamente ao tipo de condicionamento, 38 pacientes foram submetidos a condicionamento de intensidade reduzida (49,4%) e 39 a condicionamento mieloblatoivo (50,6%).

Tabela 6 – Caracterização da informação relativa ao transplante

Variáveis	n (%)
<b>HLA (n=77)</b>	
HLA-idêntico	62 (80,5%)
HLA-não idêntico	15 (19,5%)
<b>Fonte de células progenitoras (n=77)</b>	
Medula Óssea	11 (14,3%)
Sangue Periférico	66 (85,7%)
<b>Condicionamento (n=77)</b>	
Intensidade reduzida	38 (49,4%)
Mieloblatoivo	39 (50,6%)

## 2. Caracterização da infeção por EBV

A pesquisa de EBV foi realizada em 38 dos 77 doentes. O tempo até pesquisa de EBV apresentou uma mediana de 48,5 dias, apresentando um mínimo de 15 dias e um máximo de 433 dias, sendo que em três casos a pesquisa ultrapassou o primeiro ano após o transplante (Figura 11). Dos 38 doentes em que foi realizada a pesquisa de EBV, 15 foram positivos para EBV e os restantes 23 negativos. Relativamente ao tempo até infeção por EBV, a mediana foi de 56 dias, o mínimo de 19 dias e o máximo de 393 dias (Figura 11).

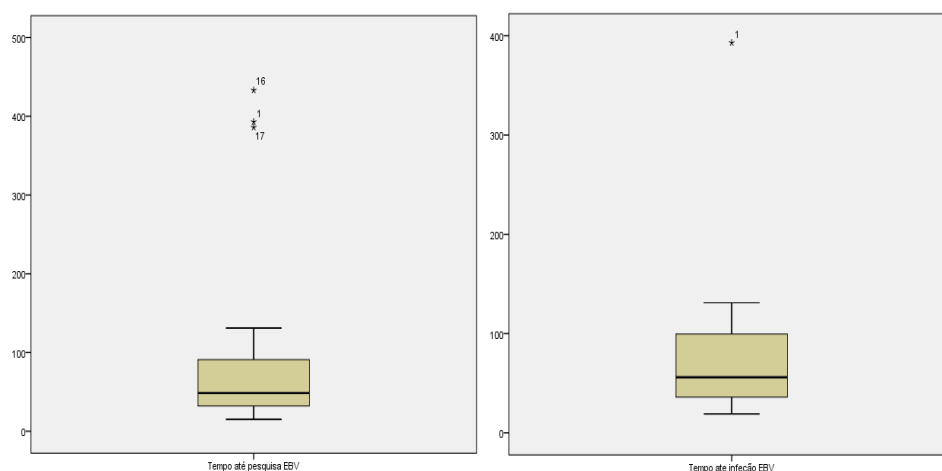


Figura 11 – Gráficos representativos da distribuição do tempo até infeção por EBV.

Quanto à carga viral do EBV nos 15 casos positivos, após análise dos resultados, a média obtida foi de 3,47 log cópias/mL sangue (2,37-5,43 log cópias/mL sangue).

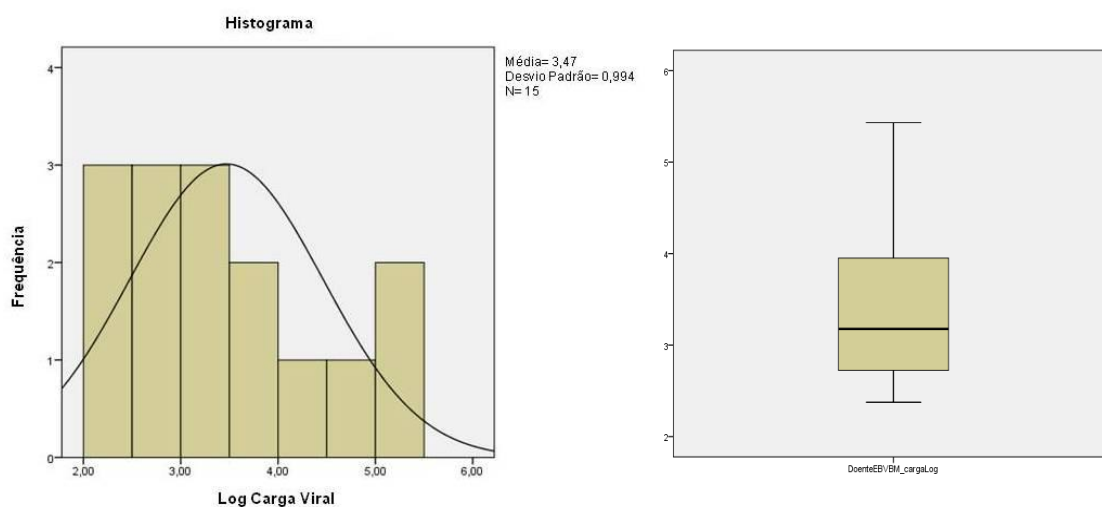


Figura 12 - Gráficos representativos da distribuição da carga viral em escala logarítmica.

Na tabela 7, encontra-se a caracterização da infeção por EBV para as diferentes variáveis analisadas nos doentes e nos dadores.

Tabela 7 – Caracterização da infeção por EBV segundo as diferentes variáveis

	EBV- n(%)	EBV+ n(%)	p	OR	IC95%
Sexo Doente					
Feminino	7 (50,0)	7 (50,0)	0,311	0,50	0,13-1,92
Masculino	16 (66,7)	8 (33,3)			
Patologia					
Leucemias Agudas	11 (57,9)	8 (42,1)	0,033	-	-
Doenças Mieloproliferativas Crônicas	2 (100,0)	0 (0,0)			
Doenças Linfoproliferativas Crônicas	7 (87,5)	1 (12,5)			
S. Mielodisplásicos/ Mieloproliferativos	2 (66,7)	1 (33,3)			
Anemia Aplástica	0 (0,0)	5 (100,0)			
Outros	1 (100,0)	0 (0,0)			
Outras Patologias	12 (63,2)	7 (36,8)	0,740	1,25	0,34-4,59
Leucemias Agudas	11 (57,9)	8 (42,1)			
Tipo Sanguíneo Doente					
A Rh-	2 (50,0)	2 (50,0)	0,494	-	-
A Rh+	8 (57,1)	6 (42,9)			
A/O Rh-	0 (0,0)	1 (100,0)			
AB Rh+	0 (0,0)	1 (100,0)			
B Rh+	2 (66,7)	1 (33,3)			
O Rh+	11 (73,3)	4 (26,7)			
Relação Dador-Recetor					
Aparentado	15 (75,0)	5 (25,0)	0,054	3,75	0,95-14,8
Não Aparentado	8 (44,4)	10 (55,6)			
HLA					
HLA-idêntico	18 (75,0)	6 (25,0)	0,017	5,40	1,25-22,6
HLA-não idêntico	5 (35,7)	9 (64,3)			
Sexo Dador					
Feminino	11 (61,1)	7 (38,9)	0,944	1,05	0,28-3,86
Masculino	12 (60,0)	8 (40,0)			
Tipo Sanguíneo Dador					
A Rh-	20 (69,0)	9 (31,0)	0,057	-	-
A Rh+	2 (25,0)	6 (75,0)			
O Rh+	1 (100,0)	0 (0,0)			
Condicionamento					
Mieloblativo	9 (81,8)	2 (18,2)	0,087	4,17	0,76-25,0
Intensidade Reduzida	14 (51,9)	13 (48,1)			
Fonte de células progenitoras					
Sangue Periférico	21 (70,0)	9 (30,0)	0,024	7,14	1,17-50,0
Medula Óssea	2 (25,0)	6 (75,0)			

No que diz respeito à distribuição da infeção por EBV, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas variáveis sexo (doentes e dadores) e tipo sanguíneo (doentes e dadores).

Verificou-se que a patologia mais frequente foi as leucemias agudas. Dos 19 doentes com esta patologia, 8 eram EBV positivos. O valor de  $p=0,033$  pode estar relacionado com o facto dos indivíduos com anemia aplástica serem todos EBV positivos.

As variáveis que apresentaram resultados estatisticamente significativos foram a compatibilidade HLA e a fonte de células progenitoras. Nos casos em que os dadores apresentavam HLA-não idêntico, o risco para infeção por EBV era 5,40 vezes superior ( $p=0,017$ ;  $OR=5,40$ ;  $IC95\%$  1,25-22,6). Relativamente à fonte de células progenitoras, o risco para infeção por EBV era superior nos doentes transplantados a partir da medula óssea ( $p=0,024$ ;  $OR=7,14$ ;  $IC95\%$  1,17-50,0).

Quanto à relação dador/recetor e ao tipo de regime de condicionamento, apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, verifica-se um risco aumentado para infeção por EBV: 1) nos casos em que o dador é não relacionado, apresentando um risco aumentado em 3,75 vezes ( $p=0,054$ ;  $OR=3,75$ ;  $IC95\%$  0,95-14,8); 2) e nos casos em que o regime de condicionamento foi de intensidade reduzida, apresentando um risco aumentado em 4,17 vezes ( $p=0,087$ ;  $OR=4,17$ ;  $IC95\%$  0,76-25,0).

### 3. Caracterização dos polimorfismos genéticos

Na tabela 8, encontra-se a caracterização dos vários polimorfismos nos recetores e nos dadores para os diferentes genótipos.

Tabela 8 - Genótipo dos recetores e dos dadores para os diferentes polimorfismos

	n (%)			P
<b>CR2 +24T&gt;C (rs3813946)</b>	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>	
Recetores (n=71)	44 (62,0)	24 (33,8)	3 (4,2)	0,996
Dadores (n=76)	47 (61,8)	26 (34,2)	3 (3,9)	
<b>HLA-A A&gt;T (rs2530388)</b>	<b>AA</b>	<b>AT</b>	<b>TT</b>	
Recetores (n=73)	46 (63,0)	19 (24,7)	8 (10,4)	0,844
Dadores (n=75)	44 (58,7)	21 (28,0)	10 (13,3)	
<b>HcG9 A&gt;T (rs6457110)</b>	<b>AA</b>	<b>AT</b>	<b>TT</b>	
Recetores (n=73)	16 (21,9)	30 (41,1)	27 (37,0)	0,695
Dadores (n=75)	15 (20,0)	36 (48,0)	24 (32,0)	
<b>IFNG-R1 -56C&gt;T (rs2234711)</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	
Recetores (n=68)	3 (15,8)	9 (47,4)	7 (36,8)	0,471
Dadores (n=77)	3 (21,4)	6 (42,9)	5 (35,7)	
<b>IL-1α +4854G&gt;T (rs17561)</b>	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>	
Recetores (n=73)	37 (50,7)	28 (38,4)	8 (11,0)	0,950
Dadores (n=75)	39 (52,0)	27 (36,0)	9 (12,0)	
<b>IL-1β +3954C&gt;T (rs1143634)</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	
Recetores (n=60)	34 (56,7)	21 (35,0)	5 (8,3)	0,613
Dadores (n=63)	37 (58,7)	18 (28,6)	8 (12,7)	
<b>IL-1RN +2018T&gt;C (rs419598)</b>	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>	
Recetores (n=72)	48 (66,7)	21 (29,2)	3 (4,2)	0,251
Dadores (n=19)	10 (52,6)	9 (47,4)	0 (0,0)	
<b>IL-1RN VNTR</b>	<b>A1*A1</b>	<b>A1*A2</b>	<b>Outros</b>	
Recetores (n=74)	36 (48,6)	35 (47,3)	3 (4,1)	<0,001
Dadores (n=54)	8 (14,8)	44 (81,5)	2 (3,8)	
<b>IL-2 -330T&gt;G (rs2069762)</b>	<b>GG</b>	<b>TG</b>	<b>TT</b>	
Recetores (n=70)	29 (41,4)	35 (50,0)	6 (8,6)	0,106
Dadores (n=76)	41 (53,9)	25 (32,9)	10 (13,2)	
<b>TNF-α -308G&gt;A (rs1800629)</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>	
Recetores (n=72)	55 (76,4)	15 (20,8)	2 (2,8)	0,625
Dadores (n=76)	55 (72,4)	20 (26,3)	1 (1,3)	



Relativamente à caracterização genotípica, foi possível observar que não existia diferença estatisticamente significativa para a maioria dos polimorfismos quando comparados os doentes com os dadores. Foi testado o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para todos os polimorfismos, com o intuito de verificar se as frequências obtidas eram ou não semelhantes às descritas para a população geral. Verificou-se que apenas o polimorfismo HLA-A A>T não apresentava uma distribuição normal das frequências genotípicas ( $p>0,050$ ).

A análise estatística (Teste do Qui-Quadrado) mostrou que não existem diferenças nas distribuições genotípicas entre recetores e dadores para os polimorfismos CR2 +24T>C, HLA-A A>T, HcG9 A>T, IFNG-R1 -56C>T, IL-1 $\alpha$  +4854G>T, IL-1 $\beta$  +3954C>T e TNF- $\alpha$  -308G>A ( $p>0,050$ ). Quanto aos restantes polimorfismos, observa-se diferenças, embora não significativas, na distribuição do IL-1RN +2018T>C e do IL-2 -330T>G; e no caso do IL-1RN VNTR com diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,001$ ).

#### **4. Associação dos genótipos com a infeção por EBV**

Após o transplante, o recetor passa a ter um sistema imunológico com origem nas células do dador e, por isso, o genótipo associado à resposta imunológica é o do dador. Desta forma, estudou-se a associação entre a infeção por EBV e os polimorfismos analisados. Na tabela 9, encontra-se a caracterização dos genótipos em função da presença da infeção por EBV. A análise estatística revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos ( $p > 0,050$ ). Contudo, existem diferenças pontuais em alguns polimorfismos que merecem ser analisadas.

Tabela 9 – Caracterização dos genótipos em função da presença de infeção por EBV

	n (%)		p
<b>CR2 +24T&gt;C (rs3813946)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
TT	14 (60,9)	10 (66,7)	0,848
TC	8 (34,8)	4 (26,7)	
CC	1 (4,3)	1 (6,7)	
<b>HLA-A A&gt;T (rs2530388)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
AA	9 (40,9)	9 (60,0)	0,167
AT	11 (50,0)	3 (20,0)	
TT	2 (9,1)	3 (20,0)	
<b>HcG9 A&gt;T (rs6457110)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
AA	4 (17,4)	2 (13,3)	0,664
AT	13 (56,5)	7 (46,7)	
TT	6 (26,1)	6 (40,0)	
<b>IFNG-R1 -56C&gt;T (rs2234711)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
CC	3 (13,0)	3 (20,0)	0,148
CT	10 (43,5)	10 (66,7)	
TT	10 (43,5)	2 (13,3)	
<b>IL-1α +4854G&gt;T (rs17561)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
GG	16 (69,6)	7 (50,0)	0,393
GT	5 (21,7)	6 (42,9)	
TT	2 (8,7)	1 (7,1)	
<b>IL-1β +3954C&gt;T (rs1143634)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
CC	15 (71,4)	9 (64,3)	0,523
CT	3 (14,3)	4 (28,6)	
TT	3 (14,3)	1 (7,1)	
<b>IL-1RN +2018T&gt;C (rs419598)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
TT	5 (55,6)	2 (66,7)	0,735
TC	4 (44,4)	1 (33,3)	
CC	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>IL-1RN VNTR</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
A1*A1	3 (16,7)	1 (14,3)	0,800
A1*A2	14 (77,8)	6 (85,7)	
A2*A2	1 (5,6)	0 (0,0)	
<b>IL-2 -330T&gt;G (rs2069762)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
TT	4 (17,4)	2 (14,3)	0,745
TG	7 (30,4)	6 (42,9)	
GG	12 (52,2)	6 (42,9)	
<b>TNF-α -308G&gt;A (rs1800629)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>	
GG	16 (69,6)	9 (64,3)	0,739
GA	7 (30,4)	5 (35,7)	
AA	0 (0,0)	0 (0,0)	

A análise de risco foi efetuada para avaliar se existe um risco aumentado no desenvolvimento de infeção por EBV, quando comparado o genótipo do recetor para cada polimorfismo. Esta análise foi feita apenas para os polimorfismos que demonstraram algumas diferenças na distribuição genotípica: HLA-A A>T (Portador T vs AA), HcG9 A>T

(Portador A vs TT), IFNG-R1 -56C>T (TT vs Portador C), IL-1 $\alpha$  +4854G>T (GG vs Portador T), IL-1 $\beta$  +3954C>T (TT vs Portador C) e IL-2 -330T>G (TT vs Portador G).

Tabela 10 – Análise de risco para o desenvolvimento de infeção por EBV segundo o genótipo do dador em cada doente

	n (%)		p	OR	IC95%
<b>HLA-A A&gt;T (rs2530388)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>			
Portador T	13 (59,1)	6 (40,0)	0,254	2,17	0,57-8,26
AA	9 (40,9)	9 (60,0)			
<b>HcG9 A&gt;T (rs6457110)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>			
Portador A	17 (73,9)	9 (60,0)	0,367	1,89	0,47-7,59
TT	6 (26,1)	6 (40,0)			
<b>IFNG-R1 -56C&gt;T (rs2234711)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>			
TT	10 (43,5)	2 (13,3)	0,051	5,00	0,91-27,5
Portador C	13 (56,5)	13 (86,7)			
<b>IL-1<math>\alpha</math> +4854G&gt;T (rs17561)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>			
GG	16 (69,6)	7 (50,0)	0,234	2,29	0,58-9,03
Portador T	7 (30,4)	7 (50,0)			
<b>IL-1<math>\beta</math> +3954C&gt;T (rs1143634)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>			
TT	3 (14,3)	1 (7,1)	0,515	2,17	0,20-23,2
Portador C	18 (85,7)	13 (92,9)			
<b>IL-2 -330T&gt;G (rs2069762)</b>	<b>EBV -</b>	<b>EBV +</b>			
TT	12 (52,2)	6 (42,9)	0,582	1,46	0,38-5,54
Portador G	11 (47,8)	8 (57,1)			

Após análise dos resultados, verificou-se que os polimorfismos HLA-A A>T, HcG9 A>T, IL-1 $\alpha$  +4854G>T, IL-1 $\beta$  +3954C>T e IL-2 -330T>G, apesar de apresentarem um risco aumentado, não tiveram resultados estatisticamente significativos ( $p>0,050$ ), pelo que não se pode confirmar se existe risco para o desenvolvimento de infeção por EBV.

O único polimorfismo que pareceu indicar associação mesmo que, apenas *borderline*, foi o polimorfismo do IFNG-R1 -56C>T ( $p=0,051$ ; OR=5,00; IC95% 0,91-27,5). Sendo que os indivíduos portadores do alelo C apresentam um risco cinco vezes superior para desenvolver infeção por EBV relativamente aos indivíduos com genótipo TT.



## DISCUSSÃO

## **1. Infecção por EBV em doentes submetidos a aHSCT**

A infecção desencadeada pelo EBV é uma das complicações mais comuns após aHSCT. Sabe-se que a infecção por EBV é muito prevalente, estimando-se que mais de 90% da população mundial seja serologicamente positiva para EBV (Green e Michaels, 2013; Münz, 2014). Tanto as infecções primárias como as reativações do EBV podem levar ao desenvolvimento de doenças que ameaçam a vida dos recetores de aHSCT (Uhlin *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2012).

Na literatura, existe uma grande variabilidade de dados relativamente à infecção por EBV em doentes submetidos a aHSCT, sendo que a maioria dos estudos se refere apenas à frequência da infecção por EBV nos doentes que desenvolvem PTLT. Na população estudada, verificou-se que 39,5% dos doentes (15/38) submetidos a aHSCT foram positivos para EBV. Esta percentagem de casos positivos vai de encontro ao esperado na população geral. No entanto, a pesquisa em doentes submetidos a transplante é feita maioritariamente nos grupos considerados de alto risco. São considerados fatores de alto risco a relação dador/recetor não aparentado bem como o HLA-não idêntico, o estado serológico do EBV (D+/R- ou D-/R+) e a terapia imunossupressora (Bar-Natan e Nagler, 2006). Quanto à carga viral do EBV nos 15 casos positivos, a média obtida foi de 3,47 log cópias/mL sangue. A infecção foi diagnosticada, fundamentalmente, nos primeiros 60 dias após o transplante (mediana de 56 dias), o que vai de encontro ao descrito na literatura, sendo que os doentes são mais suscetíveis a esta infecção, fundamentalmente, nos primeiros 100 dias pós-transplante. Isto porque o doente se encontra em recuperação e o seu sistema imunitário está bastante enfraquecido devido ao regime de condicionamento. Durante o regime de condicionamento pode haver ou não destruição completa da medula óssea, no entanto este processo conduz sempre a imunossupressão (enfraquecimento do sistema imune) (Reddy *et al.*, 2011; Uhlin *et al.*, 2014).

Relativamente aos fatores de risco para o desenvolvimento de infecção por EBV em doentes submetidos a aHSCT, na literatura encontram-se descritos como fatores de risco a relação dador-recetor não aparentado, o HLA-não idêntico, o estado serológico do EBV (dador/recetor) e o regime de condicionamento de intensidade reduzida (Bar-Natan e Nagler, 2006; Uhlin *et al.*, 2014). Neste estudo, verificou-se que as variáveis associadas a risco aumentado para infecção por EBV são o HLA-não idêntico e a fonte de células progenitoras. Verificou-se, então, que o desenvolvimento de infecção por EBV é cinco vezes maior em doentes com dadores cujo HLA é não idêntico ( $p=0,017$ ; OR=5,40; IC95% 1,25-22,6) e sete vezes aumentado quando a fonte de células progenitoras é a medula óssea ( $p=0,024$ ; OR=7,14; IC95% 1,17-50,0). Quanto à relação dador/recetor e ao tipo de regime de condicionamento verificou-se que, apesar dos resultados não serem

estatisticamente significativos, existe um risco aumentado para desenvolvimento de infeção por EBV nos casos em que o dador é não aparentado ( $p=0,054$ ;  $OR=3,75$ ;  $IC95\% 0,95-14,8$ ) e nos casos em que o regime de condicionamento foi de intensidade reduzida ( $p=0,087$ ;  $OR=4,17$ ;  $IC95\% 0,76-25,0$ ).

Relativamente ao HLA-não idêntico é esperado um aumento de risco para infeção por EBV, uma vez que o HLA tem um papel importante no reconhecimento do que é ou não do próprio e, por isso, no transplante o estabelecimento da compatibilidade entre dador e recetor é fundamental para que o sistema imune do recetor não ataque as células transplantadas do dador. Quanto à medula óssea como fonte de células progenitoras, uma possível explicação para o aumento de risco de infeção por EBV pode ser o facto do principal reservatório do EBV serem as células B de memória e estas se encontrarem na medula óssea.

## **2. Suscetibilidade genética**

Este é o primeiro estudo realizado numa população portuguesa a estudar os polimorfismos CR2 +24T>C, HLA-A A>T, HcG9 A>T, IFNG-R1 -56C>T, IL-1 $\alpha$  +4854G>T, IL-1 $\beta$  +3954C>T, IL-1RN +2018T>C, IL-1RN VNTR, IL-2 -330T>G e TNF- $\alpha$  -308G>A e a sua correlação com o desenvolvimento de infeção por EBV em doentes submetidos a aHSCT. Estes polimorfismos foram selecionados da literatura por apresentarem variações na resposta imunológica. A maioria destes polimorfismos tem sido associada ao desenvolvimento de neoplasias que estão associadas à infeção por EBV. Alguns deles têm sido, também, associados a GVHD após aHSCT. Desta forma, a análise dos polimorfismos e o estudo dos perfis genéticos são importantes, pois permitem identificar os indivíduos que apresentam maior risco para o desenvolvimento de uma doença.

### **2.1. Polimorfismo CR2 +24T>C (rs3813946)**

O gene CR2 desempenha um papel central no reconhecimento do EBV e na mediação da resposta imunológica (Cooper *et al.*, 1990; Fan *et al.*, 2013). Foi descrito que este recetor celular (CR2/CD21) é um dos responsáveis pelo reconhecimento da glicoproteína g350/220, o principal antígeno de superfície do EBV (Young *et al.*, 2007)

Um estudo sugere que a substituição 24C na região 5'-UTR do gene CR2 pode atuar como um factor de susceptibilidade genética para carcinoma da nasofaringe, uma vez que o gene CR2 regula a resposta imune e medeia a infeção por EBV. Níveis elevados de CR2 podem aumentar a infeção por EBV através da utilização de células B ou de células epiteliais que medeiam o desenvolvimento e a oncogénese de carcinoma da nasofaringe (Fan *et al.*, 2013). Posto isto, pretendia-se verificar se a presença do alelo C estaria ou não mais associada ao aparecimento de infeção por EBV.

Após análise dos resultados, verificou-se que o genótipo TT foi o mais frequente em ambos os grupos (62,0% nos recetores vs 61,8% nos dadores). Desta forma, a análise estatística revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,996$ ). A análise revelou, ainda, que não é possível estabelecer qualquer relação com o risco para infeção por EBV ( $p=0,848$ ), uma vez que o genótipo TT foi o mais frequente.

### **2.2. Polimorfismo HLA-A A>T (rs2530388)**

O gene HLA-A pertence ao HLA classe I, sendo que as moléculas de classe I desempenham um papel central no sistema imunitário, uma vez que fazem a apresentação de péptidos, pelo que a sua função no reconhecimento de antígenos do EBV poderá ser determinante para o desenvolvimento de uma resposta imunológica eficaz. A literatura descreve que este polimorfismo se encontra associado ao



desenvolvimento de linfoma de Hodgkin EBV positivo (Niens *et al.*, 2006; McAulay *et al.*, 2007). Adicionalmente foi, ainda, demonstrado que o alelo A está associado ao desenvolvimento de IM, sendo considerado um fator de risco para o desenvolvimento de patologias associadas ao EBV (McAulay *et al.*, 2007). Desta forma, pretendia-se verificar se a presença do alelo A estaria ou não mais associada ao aparecimento de infeção por EBV.

A análise estatística revelou que o genótipo AA foi o mais frequente em ambos os grupos (63,0% nos recetores vs 58,7% nos dadores) e, por isso, não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,844$ ),

Relativamente à associação entre os genótipos e a presença de EBV, verificou-se que os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p=0,167$ ). Contudo, visto que este polimorfismo demonstrava algumas diferenças na distribuição, nomeadamente na frequência do genótipo AA, efetuou-se a análise de risco para portadores do alelo T vs AA. Após análise dos resultados, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,254$ ), pelo que não se pode estabelecer qualquer relação com o risco para infeção por EBV.

### **2.3. Polimorfismo HcG9 A>T (rs6457110)**

O gene HcG9 encontra-se dentro da região do MHC classe I. Pensa-se que este gene seja não-codificante, contudo a sua função ainda não foi bem estudada (McAulay *et al.*, 2007).

A literatura descreve que, tal como o HLA-A A>T, este polimorfismo encontra-se associado ao desenvolvimento de linfoma de Hodgkin EBV positivo (Niens *et al.*, 2006; McAulay *et al.*, 2007). Foi, ainda, demonstrado que o alelo T está associado ao desenvolvimento de IM, sendo considerado um fator de risco para o desenvolvimento de patologias associadas ao EBV (McAulay *et al.*, 2007). Desta forma, pretendia-se verificar se a presença do alelo T estaria ou não mais associada ao aparecimento de infeção por EBV.

A análise estatística demonstrou que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,695$ ), uma vez que os genótipos TT e AT foram os mais frequentes em ambos os grupos (41,1% e 37,0% nos recetores vs 48,0% e 32,0% nos dadores, respetivamente).

Quando se faz a comparação do perfil genético em função da presença de EBV, verifica-se que os resultados, também, não foram estatisticamente significativos ( $p=0,664$ ). Contudo, visto que este polimorfismo demonstrou diferenças na distribuição genotípica, efetuou-se a análise de risco para portadores do alelo A vs TT. Os resultados

obtidos demonstraram que não é possível estabelecer qualquer relação com o risco para infeção por EBV ( $p=0,367$ ).

#### **2.4. Polimorfismo IFNG-R1 -56C>T (rs2234711)**

Vários estudos sugerem que alterações no recetor do IFN- $\gamma$  podem afetar a transcrição do gene, sendo que o alelo T está associado a menor expressão da subunidade IFNG-R1 e, conseqüentemente, menor atividade do IFN- $\gamma$ , favorecendo a modificação da resposta imunológica de Th1 para Th2 (Thye *et al.*, 2003; Tiroch *et al.*, 2005). Mais recentemente este polimorfismo foi associado à suscetibilidade para infeção por *Helicobacter pylori*, que pode levar ao desenvolvimento precoce de cancro gástrico (Canedo *et al.*, 2008).

Neste estudo, a análise estatística revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,471$ ), sendo o genótipo CT foi o mais frequente em ambos os grupos (47,4% nos recetores vs 42,9% nos dadores).

Quando se faz a comparação do perfil genético em função da presença de EBV, verifica-se que os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p=0,148$ ). Contudo, visto que este polimorfismo demonstrou diferenças na distribuição genotípica, efetuou-se a análise de risco para TT vs portadores do alelo C. Após análise dos resultados, verificou-se que apesar das diferenças terem limitação estatística ( $p=0,051$ ), os portadores do alelo C têm um risco cinco vezes superior para desenvolvimento de infeção por EBV relativamente ao genótipo TT ( $p=0,051$ ; OR=5,00; IC95% 0,91-27,5).

#### **2.5. Polimorfismo IL-1 $\alpha$ +4854G>T (rs17561)**

O gene IL1A é responsável pela expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 $\alpha$  que desempenha um papel importante na mediação da inflamação bem como na iniciação da resposta imune contra vírus (Liu *et al.*, 2013). O polimorfismo rs17561 tem sido associado a doenças inflamatórias, refletindo um aumento de produção de IL-1 $\alpha$  em indivíduos portadores do alelo T (Li *et al.*, 2014). Este polimorfismo tem sido, ainda, associado a diversas patologias, nomeadamente ao carcinoma do ovário (Li *et al.*, 2014) e ao carcinoma gástrico (Durães *et al.*, 2014).

Neste estudo, a análise estatística revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,950$ ), sendo o genótipo GG foi o mais frequente em ambos os grupos (50,7% nos recetores vs 52,0% nos dadores).

Na comparação do perfil genético em função da presença de EBV, verificou-se que os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p=0,393$ ), mas uma vez que

este polimorfismo demonstrou diferenças na distribuição genotípica, efetuou-se a análise de risco para GG vs portadores do alelo T. Após análise dos resultados, verificou-se que estes não foram estatisticamente significativos ( $p=0,234$ ).

## **2.6. Polimorfismo IL-1 $\beta$ +3954C>T (rs1143634)**

O gene IL1B está localizado no braço longo do cromossoma 2 e expressa a interleucina IL-1 $\beta$  que desempenha uma função semelhante à da IL-1 $\alpha$  no processo de inflamação e na imunidade (Liu *et al.*, 2013). A produção de IL-1 $\beta$  é um importante fator de iniciação na cascata de eventos que resultam na inflamação. Níveis elevados desta citocina no soro e no fígado têm demonstrado inibir a ativação de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , bem como a atividade antiviral (Omran *et al.*, 2013). Vários trabalhos demonstram que este polimorfismo pode estar relacionado com a ocorrência de diversos cancros, como por exemplo o cancro da mama (Pooja *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Um estudo demonstrou, ainda, que os indivíduos portadores do alelo T não são capazes de desenvolver uma resposta eficaz contra vírus (Omran *et al.*, 2013). Desta forma, pretendia-se verificar se os indivíduos portadores do alelo T apresentavam ou não maior predisposição para desenvolver infeção por EBV.

Neste estudo, a análise estatística revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,613$ ), sendo o genótipo CC foi o mais frequente em ambos os grupos (56,7% nos recetores vs 58,7% nos dadores).

Relativamente à comparação do perfil genético em função da presença de EBV, verificou-se que os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p=0,523$ ). No entanto, este polimorfismo demonstrou diferenças na distribuição genotípica, efetuando-se, assim, a análise de risco para TT vs portadores do alelo C. Após análise dos resultados, não se observou qualquer diferença estatisticamente significativa ( $p=0,515$ ), pelo que não se pode estabelecer qualquer relação com o risco para infeção por EBV.

## **2.7. Polimorfismos IL-1RN**

O antagonista do recetor da interleucina 1 (IL1-Ra) é uma citocina anti-inflamatória expressa pelo gene IL1RN (Korthagen *et al.*, 2012). A IL-1RN evita danos celulares no caso de uma inflamação grave e prolongada e pode, também, ser utilizada para seguir a resposta imune, uma vez que os seus níveis aumentam durante as etapas finais da resposta inflamatória (Dinarello, 1991; Hurme e Santtila, 1998; Witkin *et al.*, 2002). Variações neste gene são capazes de modular a eficácia da sinalização das citocinas e, desta forma, aumentar a predisposição para a doença (Korthagen *et al.*, 2012).

A literatura descreve que estes polimorfismos podem afetar a expressão do gene tendo, por isso, um papel importante no desenvolvimento de patologias inflamatórias (Maruta *et al.*, 2008; McIntyre *et al.*, 1991) e vários cancros (nomeadamente gástrico, esófago, bexiga, mama, colorectal, pulmão, colo do útero e nasofaringe) (Burada *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2013).

### **2.7.1. Polimorfismo IL-1RN +2018T>C (rs419598)**

Neste estudo, a análise estatística revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,251$ ), sendo o genótipo TT o mais frequente em ambos os grupos (66,7% nos recetores vs 52,6% nos dadores).

Na comparação do perfil genético em função da presença de EBV, verificou-se que os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p=0,735$ ). Uma vez que este polimorfismo não demonstrou diferenças na distribuição genotípica, não se efetuou a análise de risco.

### **2.7.2. Polimorfismo IL-1RN VNTR**

Neste estudo, a análise estatística revelou que existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p<0,001$ ). O genótipo A1\*A1 foi o mais frequente nos recetores (48,6%) e o genótipo A1\*A2 foi o mais frequente nos dadores (81,5%). Estes resultados podem estar relacionados com o facto de a distribuição do polimorfismo IL-1RN VNTR ser muito diferente de país para país e considerando, ainda, que alguns dos transplantes foram realizados com dadores provenientes de outros países.

Relativamente à comparação do perfil genético em função da presença de EBV, verificou-se que os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p=0,800$ ). A análise de risco não foi efetuada, uma vez que este polimorfismo não demonstrou diferenças na distribuição genotípica.

## **2.8. Polimorfismo IL-2 -330T>G (rs2069762)**

O gene IL2 codifica a citocina IL-2, importante na proliferação de linfócitos T e B e considerada essencial na resposta imune a estímulos antigénicos (Guma *et al.*, 2014).

O polimorfismo rs2069762 está associado, maioritariamente, a doenças autoimunes, bem como a condições alérgicas (Fichna *et al.*, 2013). No entanto, foi relacionado com outros fenómenos imunológicos, como o risco de desenvolvimento de GVHD em doentes submetidos a HSCT (Fichna *et al.*, 2013; Harkensee *et al.*, 2012).

Neste estudo, a análise estatística não revelou qualquer diferença estatisticamente significativa na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,106$ ), sendo que o genótipo TG foi o mais frequente nos recetores (50,0%) e o genótipo GG foi o mais frequente nos dadores (53,9%).

Na comparação do perfil genético em função da presença de EBV, verificou-se que os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p=0,745$ ), mas visto que este polimorfismo demonstrou diferenças na distribuição genotípica, efetuou-se a análise de risco para TT vs portadores do alelo G. Após análise dos resultados, comprovou-se que não existia qualquer diferença estatisticamente significativa ( $p=0,582$ ).

## **2.9. Polimorfismo TNF- $\alpha$ -308G>A (rs1800629)**

O gene TNFA codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional (TNF- $\alpha$ ), que está envolvida na regulação de um largo espectro de processos biológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo de lípidos e coagulação (Hajeer e Hutchinson, 2001; Rodríguez *et al.*, 2012). Esta citocina tem sido implicada numa variedade de doenças, incluindo doenças auto-imunes (Durães *et al.*, 2014).

Este polimorfismo em sido associado ao desenvolvimento de cancro gástrico, colo do útero e nasofaringe (Duarte *et al.*, 2005; Gorouhi *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2012). Um estudo demonstrou, ainda, que a variação G>A no gene TNFA parece estar associada a linfoma de Hodgkin EBV negativo (Ghesquières *et al.*, 2013). Para além disso, pode aumentar o risco de desenvolvimento de GVHD em doentes submetidos a aHSCT (Hansen, 2008).

Neste estudo, a análise estatística revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes genótipos entre os doentes e os dadores ( $p=0,625$ ), sendo o genótipo GG o mais frequente em ambos os grupos (76,4% nos recetores vs 72,4% nos dadores).

Quando se faz a comparação do perfil genético em função da presença de EBV, verifica-se que os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p=0,739$ ). Visto que este polimorfismo não demonstrou diferenças na distribuição genotípica, não se efetuou a análise de risco.



## CONCLUSÃO

## CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo a avaliar a infeção por EBV e a estudar a existência de um perfil genético de suscetibilidade para infeção por EBV em doentes submetidos a aHSCT em Portugal.

Neste estudo, verificou-se que a infeção por EBV ocorreu em 39,5% dos doentes submetidos a aHSCT, nos quais foi efetuada a pesquisa de EBV; que a infeção surge nos primeiros 60 dias (mediana de 56 dias) com uma carga viral de 3,47 log cópias/mL sangue. Os dados, apesar de preliminares vão de encontro ao descrito na literatura, sendo necessário clarificar, posteriormente, quais os doentes que desenvolveram PTLD ou doença associada a EBV.

O estudo permitiu ainda identificar como fatores de risco independentes para desenvolvimento de infeção por EBV após aHSCT: os doentes cujo transplante foi realizado com dador HLA-não idêntico (risco aumentado em cinco vezes) e cuja fonte de células progenitoras era a medula óssea (risco aumentado em sete vezes). Apesar de não existir significância estatística, dado o número de casos, o regime de condicionamento de intensidade reduzida parece ser também um dos fatores de risco aumentado para o desenvolvimento de infeção por EBV. Estes dados corroboram a literatura e ajudam na definição de grupos de risco e na elaboração de estratégias para melhor seguimento dos doentes.

Relativamente ao estudo de um perfil genético de suscetibilidade imunológica para infeção por EBV, verificou-se que não existiam diferenças significativas na distribuição dos polimorfismos estudados relativamente aos recetores e dadores. No entanto, para alguns dos polimorfismos (HLA-A A>T, HcG9 A>T, IL-1 $\alpha$  +4854G>T, IL-1 $\beta$  +3954C>T e IL-2 -330T>G), parecem existir algumas diferenças no risco para o desenvolvimento de infeção por EBV o que, apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, revela a necessidade de estudar melhor estes polimorfismos. Quanto ao polimorfismo do IFNG-R1 -56C>T, considerando as devidas limitações, verificou-se que os indivíduos portadores do alelo C apresentaram um risco aumentado em cinco vezes para desenvolver infeção por EBV.

Em suma, apesar de preliminar, este trabalho indica que a infeção por EBV é um evento frequente em indivíduos submetidos a aHSCT e que o risco de desenvolvimento de infeção por EBV pode ser calculado tendo por base a informação genética relativa ao dador/recetor, tipo de condicionamento realizado, adicionando ainda informação que necessita de clarificação para a definição da existência de um perfil genético de suscetibilidade imunológica para a infeção por EBV.



## **PERSPETIVAS FUTURAS**



## **PERSPETIVAS FUTURAS**

Os resultados obtidos revelam que é necessária a realização de estudos com maior número de amostras para clarificar o papel destes polimorfismos no desenvolvimento de infeção por EBV. Para além disso, seria importante escolher casos com PTLD diagnosticado.

Será, também, importante o estudo de outros polimorfismos de genes envolvidos na resposta imunológica para além dos que foram estudados, para ajudar a definir o perfil genético de suscetibilidade imunológica para infeção por EBV em doentes submetidos a aHSCT.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akira, S (2011) Innate Immunity and Adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366(1579):2748-2755.

Amon, W; Farrell, PJ (2005) Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *Rev Med Virol.* 15(3):149-156.

Ardebili, S *et al.* (2011) Genetic Association of TNF- $\alpha$ -308 G/A and -863 C/A Polymorphisms with Late Onset Alzheimer's Disease in Azeri Turk Population of Iran. *J Res Med Sci.* 16(8):1006-1013.

Bar-Natan, M; Nagler, A (2006) Epstein-Barr Virus-Associated Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. *Isr Med Assoc J.* 8(3):205-207.

Brookes, A (1999) The essence of SNPs. *Gene.* 234(2):177-186.

Bulat-Kardum, L *et al.* (2006) Interferon-g Receptor-1 Gene Promoter Polymorphisms (G-611A; T-56C) and Susceptibility to Tuberculosis. *Scand J Immunol.* 63(2):142–150.

Burada, F *et al.* (2012) IL-1RN +2018T>C Polymorphism is Correlated with Colorectal Cancer. *Mol Biol Rep.* 40(4):2851-2857.

Callan, M (2004) The Immune Response to Epstein-Barr Virus. *Microbes Infect.* 6(10):937-945.

Canedo, P *et al.* (2008) The Interferon Gamma Receptor 1 (*IFNGR1*) -56C/T Gene Polymorphism is Associated with Increased Risk of Early Gastric Carcinoma. *Gut.* 57(11):1504-1508.

Capello, D; Gaidano, G (2009) Post-Transplant Lymphoproliferative Infection, Genetic Lesions Pathogenesis of the Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 1(2):e2009018.

Chakravarti, A (2001) To a Future of Genetic Medicine. *Nature.* 409(6822):822-823.

Chen, ML *et al.* (2014) Association Between the IL1B (-511), IL1B (+3954), IL1RN (VNTR) Polymorphisms and Graves' Disease Risk: a Meta-analysis of 11 Case-control Studies. *PLoS One*. 9(1):e86077.

Cheong, JY *et al.* (2006) Genetic Polymorphism of Interferon-gamma, Interferon-gamma Receptor, and Interferon Regulatory Factor-1 Genes in Patients with Hepatitis B Virus Infection. *Biochem Genet*. 44(5-6):246-255.

Cheuk, D (2013) Optimal Stem Cell Source for Allogeneic Stem Cell Transplantation for Hematological Malignancies. *World J Transplant*. 3(4):99-112.

Christensen, U *et al.* (2006) Family Based Association Analysis of the IL2 and IL15 Genes in Allergic Disorders. *Eur J Hum Genet*. 14(2):227-235.

Cooper, N *et al.* (1990) CR2 Complement Receptor. *J Invest Dermatol*. 94(6):112S-117S.

Cruickshank, MN *et al.* (2012) Transcriptional Effects of a Lupus-associated Polymorphism in the 5' Untranslated Region (UTR) of Human Complement Receptor 2 (CR2/CD21). *Mol Immunol*. 52(3-4):165-73.

Dierksheide, JE *et al.* (2005) IFN-g Gene Polymorphisms Associate with Development of EBV+ Lymphoproliferative Disease in Hu PBL-SCID Mice. *Blood*. 105(4):1558-1565.

Dinarelo, CA (1991) Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism. *Blood*. 77(8):1627-1652.

Duarte, I *et al.* (2005) G-308A TNF-alpha Polymorphism is Associated with an Increased Risk of Invasive Cervical Cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 334(2):588-592.

Dunmire, S *et al.* (2014) Primary EBV Infection Induces an Expression Profile Distinct from Other Viruses but Similar to Hemophagocytic Syndromes. *PLoS One*. 9(1):e85422.

Durães, C *et al.* (2014) Genetic Variants in the IL1A Gene Region Contribute to Intestinal-type Gastric Carcinoma Susceptibility in European Populations. *Int J Cancer*. 135(6):1343-1355.

Durães, C *et al.* (2014) Polymorphisms in the TNFA and IL6 Genes Represent Risk Factors for Autoimmune Thyroid Disease. *PLoS One*. 9(8):e105492.

Epstein, A *et al.* (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1(7335):702-703.

Fan, Q *et al.* (2013) Functional Polymorphism in the 5'-UTR of CR2 is Associated with Susceptibility to Nasopharyngeal Carcinoma. *Oncol Rep*. 30(1):11-16.

Faulkner, G *et al.* (2000) The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol*. 8(4):185-189.

Fichna, M *et al.* (2013) Polymorphic Variant at the IL2 Region is Associated with Type 1 Diabetes and May Affect Serum Levels of Interleukin-2. *Mol Biol Rep*. 40(12):6957-6963.

Fraser, DA *et al.* (2003) Polymorphisms in the Interferon-gamma Receptor-1 Gene Marker and Susceptibility to Periodontitis. *Acta Odontol Scand*. 61(5):297-302.

Fuji, S *et al.* (2014) Possible Implication of Bacterial Infection in Acute Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Oncol*. 4:89.

Gelfand, Y *et al.* (2014) VNTRseek – a Computational Tool to Detect Tandem Repeat Variants in High-Throughput Sequencing Data. *Nucleic Acids Res*. 42(14):8884-8894.

Geneugelijck, K *et al.* (2014) Predicting Alloreactivity in Transplantation. *J Immunol Res*. 2014:159479.

Ghesquières, H *et al.* (2013) Cytokine Gene Polymorphisms and Progression-free Survival in Classical Hodgkin Lymphoma by EBV Status: Results from two Independent Cohorts. *Cytokine*. 64(2):523-531.

Glutz, D *et al.* (2012) The Seville Expert Workshop for Progress in Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Transplantation*. 94(8):784-793.

Gorouhi, F *et al.* (2008) Tumour-Necrosis Factor- $\alpha$  Polymorphisms and Gastric Cancer Risk: a Meta-Analysis. *Br J Cancer*. 98(8):1443-1451.

Granowitz, EV *et al.* (1991) Interleukin-1 Receptor Antagonist Competitively Inhibits the Binding of Interleukin-1 to the Type II Interleukin-1 Receptor. *J Biol Chem*. 266(22):14147-14150.

Green, M; Michaels, M (2013) Epstein-Barr Virus Infection and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *Am J Transplant*. 13(3):41-54.

Grivennikov, S *et al.* (2010) Immunity, Inflammation and Cancer. *Cell*. 140(6):883-899.

Grywalska, E *et al.* (2013) Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. *Postepy Hig Med Dosw*. 67:481-490.

Guan, H *et al.* (2007) NK Cells Enhance Dendritic Cell Response Against Parasite Antigens via NKG2D Pathway. *J Immunol*. 179(1):590-596.

Gulley, M; Tang, W (2010) Using Epstein-Barr Viral Load Assays to Diagnose, Monitor and Prevent Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *Clin Microbiol Rev*. 23(2):350-366.

Guma, SR *et al.* (2014) Aerosol Interleukin-2 Induces Natural Killer Cell Proliferation in the Lung and Combination Therapy Improves the Survival of Mice with Osteosarcoma Lung Metastasis. *Pediatr Blood Cancer* 61(8):1362-1368.

Hajeer, AH; Hutchinson, IV (2001) Influence on TNF $\alpha$  Gene Polymorphisms on TNF $\alpha$  Production and Disease. *Hum Immunol*. 62(11):1191-1199.

Hansen, J (2008) Genomic and Proteomic Analysis of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Outcome. Seeking Greater Understanding the Pathogenesis of GVHD and Mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 15(1):e1-7.

Harkensee, C *et al.* (2012) Single Nucleotide Polymorphisms and Outcome Risk in Unrelated Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation: an Exploration Study. *Blood*. 119(26):6365-6372.

Hauptscchein, R *et al.* (1992) TaqI RFLP in the Interferon Gamma Receptor 1 Gene (IFNGR1) on Human Chromosome 6q. *Nucleic Acids Res.* 20(5):1158.

He, J *et al.* (2010) Analysis of Functional SNP in *Ifng1fng1* in Chinese Han Population with Tuberculosis. *Scand J Immunol.* 71(6):452–458.

Hurme, M; Santtila, S (1998) IL-1 Receptor Antagonist (IL-1Ra) Plasma Levels are Co-ordinately Regulated by Both IL-1Ra and IL-1beta Genes. *Eur J Immunol.* 28(8):2598-2602.

Ibrahim, H; Naresh, K (2012) Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Adv Hematol.* 2012:230173.

Jin, L *et al.* (2013) Association of Tumor Necrosis Factor-Alpha Promoter Variants with Risk of HPV-Associated Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer.* 12:80.

Kalinova, L *et al.* (2009) Post-transplant Lymphoproliferative Disorder. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 153(4):251-257.

Kim, M *et al.* (2010) Hematopoietic Stem Cell Transplantation after Post-transplant Lymphoproliferative Disorder. *J Korean Med Sci.* 25:781-784.

Klein, E (1998) The Complexity of the Epstein-Barr Virus Infection in Humans. *Pathol Oncol Res.* 4(1):3-7.

Koch, O *et al.* (2002) IFNGR1 Gene Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Cerebral Malaria. *J Infect Dis.* 185(11):1684-1687.

Korthagen, N *et al.* (2012) IL1RN Genetic Variations and Risk of IPF: a Meta-analysis and mRNA Expression Study. *Immunogenetics.* 64(5):371-377.

Kumar, H *et al.* (2011) Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol.* 30(1):16-34.

Kuppers, R (2003) B Cells under Influence: Transformation of B Cells by *Epstein-Barr* Virus. *Nat Rev Immunol.* 3(10):801-812.

Li, J *et al.* (2014) Genetic variations in IL1A and IL1RN are Associated with the Risk of Preeclampsia in Chinese Han Population. *Sci Rep.* 4:5250.

Liu, J *et al.* (2011) Polymorphisms of Interleukin-10 Promoter are not Associated with Prognosis of Advanced Gastric Cancer. *World J Gastroenterol.* 17(10):1362-1367.

Liu, Y *et al.* (2013) Genetic Variants in IL1A and IL1B Contribute to the Susceptibility to 2009 pandemic H1N1 influenza A virus. *BMC Immunol.* 14:37.

Malmgaard, L (2004) Induction and Regulation of IFNs During Viral Infections. *J Interferon Cytokine Res.* 24(8):439-454.

Maruta, Y *et al.* (2008) Determination of Ancestral Allele for Possible Human Cancer-Associated Polymorphisms. *Cancer Genet Cytogenet.* 180(1):24-29.

McAulay, K *et al.* (2007) HLA Class I Polymorphisms are Associated with Development of infectious Mononucleosis upon Primary EBV Infection. *J Clin Invest.* 117(10):3042-3048.

McAulay, K *et al.* (2009) Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism: a Predictive Factor for the Development of Post-Transplant Lymphoproliferative Disease. *Br J Cancer.* 101(6):1019-1027.

McIntyre, KW *et al.* (1991) Inhibition of Interleukin 1 (IL-1) Binding and Bioactivity in vitro and Modulation of Acute Inflammation in vivo by IL-1 Receptor Antagonist and anti-IL-1 Receptor Monoclonal Antibody. *J Exp Med.* 173(4):931-939.

Mogensen, T (2009) Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev.* 22(2):240-273.

Mohamed, HS *et al.* (2003) Genetic Susceptibility to Visceral Leishmaniasis in the Sudan: Linkage and Association with IL4 and IFNGR1. *Genes Immun.* 4(5):351-355.



Morscio, J *et al.* (2013) Molecular Pathogenesis of B-Cell Posttransplant Lymphoproliferative Disorder: What Do We Know So Far? *Clin Dev Immunol.* 2013:150835.

Moss, P; Rickinson, A (2005) Cellular Immunotherapy for Viral Infection after HSC Transplantation. *Nat Rev Immunol.* 5(1):9-20.

Münz, C (2014) Dendritic Cells During *Epstein-Barr* Virus Infection. *Front Microbiol.* 5:308.

Niens, M *et al.* (2006) The Human Leukocyte Antigen Class I Region is Associated with EBV-positive Hodgkin's Lymphoma: HLA-A and HLA Complex Group 9 are Putative candidate Genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(11):2280–2284.

O'Meara, A *et al.* (2014) Forty Years of Haematopoietic Stem Cell Transplantation: a Review of the Basel Experience. *Swiss Med Wkly.* 144:w13928.

Omran, MH *et al.* (2013) Relation of Interleukin-1 $\beta$  Gene to Treatment Response in Chronic Patients Infected with HCV Genotype 4. *J Infect Dev Ctries.* 7(11):851-858.

Orio, F *et al.* (2014) Endocrinopathies After Allogeneic and Autologous Transplantation of Hematopoietic Stem Cells. *ScientificWorldJournal.* 2014:282147.

Paludan, S *et al.* (2011) Recognition of Herpesviruses by the Innate Immune System. *Nat Rev Immunol.* 11(2):143-154.

Pang, I; Iwasaki, A (2012) Control of Antiviral Immunity by Pattern Recognition and the Microbiome. *Immunol Rev.* 245(1):209-226.

Pooja, S *et al.* (2012) Polymorphic variations in IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 genes, their Circulating Serum Levels and Breast Cancer Risk in Indian Women. *Cytokine* 60(1):122-128.

Reddy, N *et al.* (2011) Strategies to Prevent EBV Reactivation and Posttransplant Lymphoproliferative Disorders (PTLD) after Allogeneic Stem Cell Transplantation in High-Risk Patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 17(5):591-597.

Rodríguez, LR *et al.* (2012) Genetic Markers of Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* 2012:574817.

Salih, MA *et al.* (2007) IFNG and IFNGR1 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis in Sudan. *Genes Immun.* 8(1):75-78.

Sousa, H *et al.* (2012) Genetic Risk Markers for Nasopharyngeal Carcinoma in Portugal: Tumor Necrosis Factor Alpha -308G>A Polymorphism. *DNA Cell Biol.* 30(2):99-103.

Sousa, H *et al.* (2012) IL-1RN VNTR Polymorphism and Genetic Susceptibility to Cervical Cancer in Portugal. *Mol Biol Rep.* 39(12):10837-10842.

Sousa, H *et al.* (2013) IL-1RN VNTR Polymorphism as a Susceptibility Marker for Nasopharyngeal Carcinoma in Portugal. *Arch Oral Biol.* 58(8):1040-1046.

Sultani, M *et al.* (2012) Anti-Inflammatory Cytokines: Important Immunoregulatory Factors Contributing to Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis. *Chemother Res Pract.* 2012:490804.

Swain, S *et al.* (2012) Expanding Roles for CD4<sup>+</sup> T Cells in Immunity to Viruses. *Nat Rev Immunol.* 12(2):136-148.

Tempera, I *et al.* (2011) EBV Latency Types Adopt Alternative Chromatin Conformations. *PLoS Pathog.* 7(7): e1002180.

Thompson, MP; Kurzrock, R (2004) Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clin Cancer Res.* 10(3):803-821.

Thye, T *et al.* (2003) Genowide Linkage Analysis Identifies Polymorphism in the Human Interferon-gamma Receptor Affecting Helicobacter pylori Infection. *Am J Hum Genet.* 72(2):448-453.

Tiroch, K *et al.* (2005) Interferon-gamma and Interferon-gamma Receptor 1 and 2 Gene Polymorphisms and Restenosis Following Coronary Stenting. *Atherosclerosis.* 182(1):145-151.

Uhlin, M *et al.* (2013) Risk Factors for Epstein-Barr Virus-Related Post-Transplant Lymphoproliferative Disease After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Haematologica*. 99(2):346-352.

Witkin, SS *et al.* (2002) Influence of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism on Disease. *Clin Infect Dis*. 34(2):204-209.

Wu, FL *et al.* (2013) Interleukin-1 $\beta$  +3954 Polymorphisms and Risk of External Apical Root Resorption in Orthodontic Treatment: A Meta-analysis. *Genet Mol Res*. 12(4):4678-4686.

Xuan, L *et al.* (2012) Effects of Intensified Conditioning on Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Hematological Malignancies. *J Hematol Oncol*. 5:46.

Yancoski, J *et al.* (2012) A Novel Internalization Motif Regulates Human IFN- $\gamma$ R1 Endocytosis. *J Leukoc Biol*. 92(2):301-308.

Yokoyama, W; Colonna, M (2008) Innate Immunity to Pathogens. *Curr Opin Immunol*. 20(1):1-2.

Young, KA *et al.* (2007) Isolating the Epstein-Barr Virus gp350/220 Binding Site on Complement Receptor Type 2 (CR2/CD21). *J Biol Chem*. 282(50):36614-36625.

Young, LS; Murray, PG (2003) Epstein-Barr Virus and Oncogenesis: from Latent Genes to Tumours. *Oncogene*. 22(33):5108-5121.

Young, LS; Rickinson, AB (2004) Epstein-Barr Virus: 40 Years On. *Nat Rev Cancer*. 4(10):757-768.

Zhang, Y *et al.* (2012) IL1 Receptor Antagonist Gene IL1-RN Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism and Cancer Risk: A Literature Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 7(9):e46017.